ISOLIERUNG DER PHOSPHOPROTEINE PP 105 UND PP 135 UND CHARAKTERISIERUNG IHRER MOLEKULAREN EIGENSCHAFTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JOACHIM PFEIFLE
aus Stuttgart

1983

ISOLIERUNG DER PHOSPHOPROTEINE PP 105 UND PP 135 UND CHARAKTERISIERUNG IHRER MOLEKULAREN EIGENSCHAFTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JOACHIM PFEIFLE
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 8.2.1983

Dekan	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter	Prof. Dr. F.A. Anderer
2. Berichterstatter	Prof. Dr. D. Mecke

Ich danke Herrn Prof. Dr. F.A. Anderer für die großzügige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft beim Zustandekommen dieser Arbeit.
Allen Mitarbeitern der Abteilung Anderer gilt mein Dank für die Mithilfe bei der Bewältigung technischer Probleme. Insbesondere danke ich Frl. S. Himmer für die Unterstützung bei der experimentellen Arbeit, Frau B. Krafczyk für die Großproduktion von Rührzellen und Frl. S. Glock für das Bluten der Ratten. Den Biochemiestudenten M. Wolff und M. Pfaff danke ich für die Mithilfe bei der Cytosolpräparation. Herrn M. Wolff möchte ich insbesondere für die Phosphatbestimmungen und die Präparation des P-Tyrosins danken.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	ERGEBNISSE	8
1.	Biologische Systeme	8
2.	Subzelluläre Verteilung der Phosphoproteine pp 105 und pp 135	9
2.1.	Intrazelluläre Lokalisierung	9
2.2.	Aufschluß der Zellen	11
2.3.	Grobe Zellfraktionierung	13
2.4.	Einfluß der Mg^{2+}-Konzentration auf die Verteilung der endogenen phosphorylierbaren Phosphoproteine	14
3.	Isolierung der Phosphoproteine pp 105 und pp 135	16
3.1.	Nachweis der Phosphoproteine	16
3.2.	Kriterien der endogenen Cytosolphosphorylierung	17
3.2.1.	Mg^{2+}-Fällbarkeit der Phosphoproteine	17
3.2.2.	Abhängigkeit der endogenen Phosphorylierung von der Mg^{2+}-Konzentration	19
3.2.3.	Zeitabhängigkeit der endogenen Phosphorylierung	20
3.2.4.	Hemmbarkeit der Proteinphosphatasen	22
3.3.	Chromatographische Verfahren zur Reindarstellung von pp 105 und pp 135	24
4.	Isolierung einer cytosolischen Phosvitinkinase	32
4.1.	Testsystem	32
4.2.	Verfahren zur Reindarstellung einer Phosvitinkinase	33
4.3.	Charakterisierung der gereinigten Phosvitinkinase	37
5.	Charakterisierung des gereinigten pp 105	40
5.1.	Identität der cytosolischen mit den Zelloberfläche-gebundenen Phosphoproteinen pp 105 und pp 135	40

Seite

5.2. Molekulargewicht 41

5.3. Phosphatgehalt von pp 105 42

5.4. Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Fällbarkeit 43

5.5. Charakterisierung der pp 105 Kinaseaktivität 44

5.5.1. Kinaseaktivität ist keine Begleitverunreinigung von pp 105 45

5.5.2. Zeitabhängigkeit der pp 105 Autophosphorylierung 46

5.5.3. pH-Abhängigkeit der pp 105-Autophosphorylierung 46

5.5.4. Abhängigkeit der pp 105 Kinase von der Salzkonzentration 47

5.5.5. Abhängigkeit der pp 105 Kinase von zweiwertigen Kationen 47

5.5.6. Substratspezifität der pp 105 Kinaseaktivität 49

5.5.7. Phosphoaminosäuren des autophosphorylierten pp 105 50

5.5.8. Einfluß von Effektoren auf die Autophosphorylierung von pp 105 51

6. Vorkommen der Phosphoproteine pp 105 und pp 135 52

6.1. Verteilung der Phosphoproteine pp 105 und pp 135 auf das Normalgewebe der STU-Maus 52

6.2. Endogene Phosphorylierung intakter Zellen verschiedener Zellinien - immunologischer Nachweis von pp 105 und pp 135 54

6.3. Produktion monospezifischer Antiseren gegen pp 105 und pp 135 57

6.4. Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von pp 105 und pp 135 58

6.4.1. Spezifität des verwendeten Antikörpers 59

6.4.2. Immunlokalisation von pp 105 und pp 135 auf der Oberfläche adhärenter und Suspensionszellen (STU 51A-232B) 59

6.4.3. Intrazelluläre Immunlokalisation von pp 105 und pp 135 62

Seite

7. Potentielle biologische Funktionen der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 66

7.1. In vivo Phosphorylierung der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 66

7.2. Nachweis von pp 105 und pp 135 in Nucleoli 67

7.3. Mitogene Aktivität von pp 105 70

III. ZUSAMMENFASSUNG 73

IV. DISKUSSION 76

V. MATERIAL UND METHODEN 81

1. Zellen und Zellkultur 81

2. Standardphosphorylierungsbedingungen 82

2.1. Zellhomogenate und -fraktionen 82

2.2. Intakte Zellen 82

3. Gelelektrophorese 83

4. Autoradiographie 83

5. Quantifizierung des ^{32}P-Einbaus in pp 105 und pp 135 84

6. Isolierung der Phosphoproteine pp 105 und pp 135 84

6.1. Cytosolpräparation 84

6.2. Detektion Phosphoproteinhaltiger Fraktionen 84

6.3. Säulenchromatographische Verfahren 85

6.4. Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese für pp 135 86

6.5. Bestimmung der Anreicherung von pp 105 und pp 135 86

7. Proteinbestimmungen 86

8. Isolierung einer cytosolischen Phosvitinkinase 87

Seite

8.1. Kinasetest 87
8.2. Reinigungsschritte 87
9. Herstellung von Adsorbentien für Affinitätschromatographie 88
9.1. Aktivierung von Sepharose 4B 88
9.2. Kupplung 88
10. Spaltungen mit Staphylococcus aureus V 8 Protease 88
11. Bestimmung der Glucose-6 Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität 89
12, Gelelektrophoretische Elution von Proteinen 89
13. Bestimmung des Phosphatgehalts von Proteinen 90
14. Analyse der Phosphoaminosäuren 90
15. Produktion und Reinigung von Antiseren 91
15.1. Immunisierung der Tiere und Blutentnahme 91
15.2. Gewinnung und Lagerung der Seren 92
15.3. Reinigung der Antiseren 92
16. Immunologische Techniken 93
16.1. Immuntransfer (Western Blot) 93
16.2. Immundiffusion nach Ouchterlony 94
16.3. Immunpräzipitation 94
16.4. Indirekte Immunfluoreszenz-mikroskopie 95
16.4.1. Vorbereitung der Proben 95
16.4.2. Immunabsorption der fluoreszenz-markierten 2. Antikörper 96
16.4.3. Fixierung 96
16.4.4. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung 96
17. In vivo Markierung von Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat 97
18. Isolierung von Nucleoli 98
19. Tests auf mitogene Aktivität 98
19.1. Mitogene Aktivität an Embryonal-zellen 98
19.2. Mitogene Aktivität an Thymocyten 99

Seite

20. Materialien 99

VI. ABKÜRZUNGEN 101

VII. LITERATUR 102

I. EINLEITUNG

Die Erhaltung des physiologischen Gleichgewichts einer Zelle bei einem ständig wechselnden inneren und äußeren Milieu erfordert eine schnelle Koordination und Regulation zellulärer Prozesse.

Als einer der wichtigsten Regulationsmechanismen gilt die reversible kovalente Modifikation von Proteinen. Von den wenigstens 125 verschiedenen posttranslational kovalenten Modifikationen gelten nur wenige als wirklich reversibel.

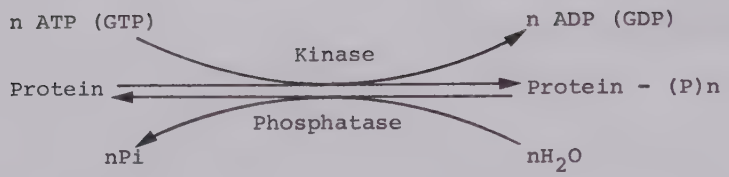
Zu ihnen gehören die Phosphorylierung, Adenylierung, Uridylierung, Acetylierung, Methylierung und die Umwandlung von Thiol- in Disulfidreste (1).

Vor allem scheinen reversible Phosphorylierungsreaktionen bei einer Unzahl zellulärer Regulationsvorgänge eine bedeutende Rolle zu spielen (1-10).

Bis heute kennt man etwa 30 Enzyme, deren Aktivität über eine reversibel verlaufende Phosphorylierung gesteuert wird. Sie sind fast ausschließlich am Intermediärstoffwechsel der zellulären Bausteine beteiligt (1, 2).

Ebenso unterliegt eine große Zahl nicht enzymatischer Proteine einer reversibel verlaufenden Phosphorylierung. Sie sind von großer Bedeutung für den zellulären Transport (3, 11, 12), die Regulation der Kontraktion (13, 14), Zellform und -beweglichkeit (15) sowie das Zellwachstum und die Zellteilung (8, 16-21).

In einem allgemeinen Schema läßt sich die reversible kovalente Modifikation eines Proteins durch Phosphorylierung wie folgt darstellen:



Im allgemeinen wird dabei die Phosphatgruppe mit einem Serin- oder Threoninrest des Proteins verestert.

Durch die Einführung einer oder mehrerer negativ geladener Phosphatgruppen in ein Protein verändert sich dessen Ladung und Struktur. Dies kann zur Änderung grundlegender Eigenschaften des Proteins führen. Im Falle eines enzymatisch aktiven Proteins kann die Phosphorylierung eine Aktivierung oder Hemmung der enzymatischen Aktivität bewirken.

Die Reversibilität der Phosphorylierungsreaktion erfordert beides: eine Kinase, welche von einem Phosphatdonor (meist ATP oder GTP) den Phosphatrest auf das Zielprotein überträgt, als auch eine Phosphatase, welche den Phosphatrest wieder hydrolytisch vom Zielprotein entfernt.

Kinase wie auch Phosphatase wirken als biologische Katalysatoren. Physiologische Effektoren, welche die Aktivität von Kinase oder Phosphatase zu modifizieren vermögen, können daher selbst in kleinsten Mengen eine wirksame Veränderung des Zielproteins herbeiführen. Handelt es sich bei dem Zielprotein selbst wieder um eine Kinase oder Phosphatase, so können über die resultierende Kaskade von Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsreaktionen beachtliche physiologische Verstärkerwirkungen erreicht werden.

Somit lassen sich der reversiblen Phosphorylierung im Grunde genommen zwei Funktionen zuschreiben. Zum einen die Veränderung der biologischen Wirkungsweise eines Proteins, zum anderen die Vermittlung und Verstärkung eines biologischen Signals über eine Reaktionskaskade.

Infolge spontaner, chemisch, physikalisch oder durch Virusinfektion herbeigeführter genetischer Expressionsverände-

rungen erfolgt die Umwandlung (Transformation) einer normalen Zelle in eine Tumorzelle sicherlich nicht auf Grund nur eines einzigen molekularen Ereignisses. Sie ist vielmehr die Folge mehrerer nebeneinander und/oder aufeinanderfolgender molekularer Prozesse, die zu zahlreichen Veränderungen der Struktur und des Stoffwechsels der Zelle führen. Es ist daher zu erwarten, daß sich die mit einer Transformation der Zelle einhergehenden Veränderungen auch auf Phosphorylierungsvorgänge auswirken (22-29). Von großer Bedeutung ist jedoch die Entdeckung, daß Phosphorylierungsreaktionen zumindest in einigen durch Virusinfektion herbeigeführten Transformationen an der Etablierung und der Aufrechterhaltung des transformierten Zustands maßgeblich beteiligt sind (30-33).

Die biochemischen und biologischen Vorgänge, die zur Auslösung wie auch zur Aufrechterhaltung des Transformationszustands der Zelle führen, spielen sich vor allem an der Zellmembran ab (31, 34). Auf der äußeren wie auf der inneren Oberfläche der Zellmembran finden tiefgreifende Veränderungen statt, welche die Zellstruktur, die Permeabilität der Zellmembran, die intrazellulären und interzellulären Wechselwirkungen betreffen. Dabei handelt es sich um Vorgänge, die sich vermutlich auch bei der physiologischen Zellteilung abspielen, deren physiologische Regulation aber in der Tumorzelle aufgehoben ist, was eine unkontrollierte und unaufhörliche Zellteilung zur Folge hat.

Tumorzellen,die in vivo, d.h. im Organismus wachsen, lassen sich letztlich charakterisieren durch einen Verlust der Wachstumskontrolle sowie durch ihre Fähigkeit, invasiv zu wachsen und zu metastasieren (34) (Tab. 1).

Da Untersuchungen an Tumorzellen im Organismus nur schwer durchzuführen sind, ist man auf die Untersuchung von Tumorzellen in vitro, d.h. in Zellkultur angewiesen. Diese zeigen ein großes Spektrum von transformationsbedingten Eigenschaften, die, wie schon erwähnt, hauptsächlich die Plasmamembran betreffen (Tab. 2).

Tabelle 1: Eigenschaften von Tumorzellen in vivo (34)

Kategorie	spezifische Eigenschaft
Verlust der Wachstumskontrolle	a. vermindertes Bedürfnis fördernder Hormonstimuli
	b. vermindertes Adhäsionsbedürfnis der Zellen zur Proliferation
Verlust der Lagekontrolle	
1. Invasion	a. Veränderte Zell-Zellassoziation
	- homotyp. Affinitäten vermindert
	- heterotyp. Affinitäten vermehrt
	b. Verminderte Zell-Substrat Kontakte
	c. Fähigkeit zur Fortbewegung
	d. Zerstörungsvermögen
2. Metastasierung	a. Eintritt in den Blutkreislauf
	b. Überleben im Blutkreislauf durch mögliche Assoziationen mit Wirtszellen
	c. Aufenthalt in und Austritt durch Kapillaren (Embolusbildung, Thrombose)
Umgehung der Immunüberwachung	Verlust antigener Determinanten, Modifizierung oder Blokkierung der Immunreaktion

Tabelle 2: Eigenschaften von Tumorzellen in vitro (32)

Kategorie	spezifische Eigenschaft
Morphologie/ Adhäsion	a. Zellen runden sich ab, kaum ausgestreckt
	b. Verlust einer (parallelen) Richtung
	c. Verminderte Kontaktinhibition der Bewegung
	d. Vermindertes Festhaften am Substrat
	e. Wachstum bis zu hoher stationärer Zelldichte
	f. Bildung von Mehrzellschichten
	g. Aggregatbildung auf kontaktinhibierten normalen Einzellschichten
	h. Wachstum in Agar oder Methylcellulose
	i. Disaggregation des Cytoskeletts
Metabolismus/biochemische Veränderungen	Zunahme
	a. Zuckertransport
	b. anaerobe Glykolyse
	c. Agglutination durch Lectine
	d. Proteolytische Enzyme
	e. intrazelluläres cAMP, K^+, Ca^{2+}
	f. Sekretion von Makromolekülen
	Abnahme
	a. Bedürfnis nach Wachstumsfaktoren
	b. Glycosyltransferaseaktivität
	c. intrazelluläres cGMP
	d. Fibronectin
	Veränderungen
	a. Glykoproteine und Glykolipide
	b. Antigene Determinanten (Auftreten von Tumorantigen)

Durch RNA-haltige Tumorviren (Oncorna-Viren, Retroviren) ist es in den letzten Jahren gelungen, mehr Einblick in die Entstehung des transformierten Zustands zu erhalten (30-33).

Bei den für die Transformation essentiellen viralen Genprodukten (Src-Gen Produkt) handelt es sich um cAMP unabhängige Tyrosin-spezifische Phosphotransferasen, so daß anzunehmen ist, daß Phosphorylierungsreaktionen maßgeblich an der Etablierung und Aufrechterhaltung des Transformationszustands beteiligt sind.

Da zu jedem der untersuchten transformierenden viralen Gene ein entsprechendes zelluläres Gen in der Wirtszelle gefunden wurde (33), kann man annehmen, daß jede normale Zelle bereits die Fähigkeit zur Ausbildung des Transformationszustands in sich trägt.

Im Normalzustand unterliegen diese Mechanismen, die hauptsächlich die Zell-Substrat-Bindung bzw. Zell-Zellwechselwirkung betreffen, einer strengen Regulation. Im Transformationszustand scheint diese Regulation permanent gestört zu sein.

Phosphorylierungsreaktionen spielen hierbei vermutlich eine ganz entscheidende Rolle, so daß die Untersuchung endogener Phosphorylierungsreaktionen, besonders im Hinblick auf Zellwachstum und Zell-Zellwechselwirkung einen Einblick in die molekularen Mechanismen der Etablierung und Erhaltung des Transformationszustands ermöglicht.

In einer vorherigen Arbeit (35) konnte gezeigt werden, daß bei endogener Phosphorylierung intakter, in Suspension kultivierter Zellen unter Zugabe von ATP (GTP) Phosphat hauptsächlich in zwei auf der Zelloberfläche gelegene Proteine mit einem Molekulargewicht im SDS-Gel von 135 KD und 105 KD eingebaut wird. Die Phosphorylierung dieser Proteine ist teilweise an Zell-Zellkontakte gebunden, so daß eine Beteiligung an Zell-Zellwechselwirkungen in Frage kommen dürfte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Isolierung der beiden Phosphoproteine pp105 und pp135 aus transformierten Mäuse-

fibroblasten sowie eine Charakterisierung ihrer molekularen Eigenschaften im Hinblick auf potentielle biologische Funktionen. Mit Hilfe monospezifischer Antiseren sollte zusätzlich eine immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation beider Phosphoproteine innerhalb der Zelle vorgenommen werden.

Ferner sollte ihr Vorkommen in transformierten Zellen anderer Säugetierzellinien sowie ihre Verteilung in Normalgeweben der Maus untersucht werden. In ersten Versuchen sollte nach potentiellen biologischen Funktionen beider Phosphoproteine gesucht werden.

II. E R G E B N I S S E

1. Biologische Systeme

Die Zelloberfläche hat wichtige Funktionen bei der Zellproliferation, Differenzierung, Zell-Zellkommunikation und der Metastasierung von Tumorzellen zu übernehmen. Die Regulation vieler zellulärer Prozesse erfolgt über Proteinphosphorylierungen. Eine Beteiligung von Phosphorylierungsreaktionen bei der Etablierung und Aufrechterhaltung des transformierten Zustands gilt bei einer Reihe von virustransformierten Zellen als gesichert. Phosphorylierungsreaktionen an der Oberfläche von Zellen könnten daher von größter Bedeutung sein. Für eine Anzahl verschiedener Zellen wurden solche Oberflächenphosphorylierungen nachgewiesen und charakterisiert (22, 36-50).

Biologisch funktionelle sowie biochemische Untersuchungen solcher Phosphorylierungsreaktionen stellen besondere Anforderungen an das verwendbare biologische System. Besonders geeignet sind hierfür Zell-Linien, die in verschiedenen Wachstumszuständen als einzellige Schicht, in Suspension oder als Tumor im Tier zu halten sind.

Diese Eigenschaften zeigen SV-40 transformierte Mäusefibroblasten (STU 51A-232B), die aus einer Transformation von Embryonalzellen eines Inzuchtstammes von STU-Mäusen (51) mit dem DNS-Virus SV-40 hervorgingen (52). Auf der Oberfläche dieser in Suspension gehaltenen Zelle konnte bereits in einer früheren Arbeit (35) eine Phosphorylierungsreaktion nachgewiesen und charakterisiert werden. Es zeigte sich, daß dabei hauptsächlich zwei Phosphoproteine mit einem Molekulargewicht von 135 KD (pp 135) und 105 KD (pp 105) von einer oder mehreren cyclisch Nukleotid-unabhängigen Phosvitinkinasen phosphoryliert werden.

Für weitere vergleichende Untersuchungen wurden mit Rous Sarkoma Virus transformierte Mäusefibroblasten (STU-D1756),

mit SV-40 transformierte Hamsterfibroblasten (K 42-A 2) sowie Mäuseembryonalzellen und menschliche HeLa-Zellen herangezogen.

2. Subzelluläre Verteilung der Phosphoproteine pp 105 und pp 135

2.1. Intrazelluläre Lokalisierung

Jede der Zelloberflächen-Komponenten nimmt ihren Weg aus dem Inneren der Zelle. In keiner der oben erwähnten Arbeiten (22, 36-50) wurde untersucht, welcher Anteil der phosphorylierbaren Komponenten auf der Zelloberfläche und welchen Anteil innerhalb der Zelle vorlag. Die Kenntnis hiervon ist jedoch wichtig für eine kritische Wertung des Einflusses intrazellulärer Kontaminationen bei Zellschädigung auf das Ergebnis der Oberflächenphosphorylierung. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die endogene Phosphorylierbarkeit von Zellextrakten im logarithmischen Wachstum der Zellen am höchsten war. Für die folgenden Versuche sowie die Isolierung der Phosphoproteine und der cytosolischen Proteinkinase wurden daher ausschließlich logarithmisch in Suspension wachsende Zellen verwendet. Das logarithmische Wachstum der Zellen wurde bei einer Zelldichte von 2 - 3 x 10^6 Zellen/ml durch geeignete Verdünnung mit frischem Medium erhalten. Der Mitoseindex (53) lag bei >4 %, die Verdoppelungszeit betrug ca. 16 h. Eine Abschätzung der intrazellulär lokalisierten Menge an phosphorylierbarem pp 135 und pp 105 wurde mit STU 51A-232B Zellen in folgendem Experiment vorgenommen.

Je 8 x 10^6 Suspensionszellen wurden entweder in 600 µl Ganzzellphosphorylierungspuffer (GZPP) ohne Trypsin oder in 500 µl GZPP mit 5 µg Trypsin 10 min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Trypsinisierung mit 25 µg Trypsininhibitor in 100 µl GZPP gestoppt. Je 60 µl der

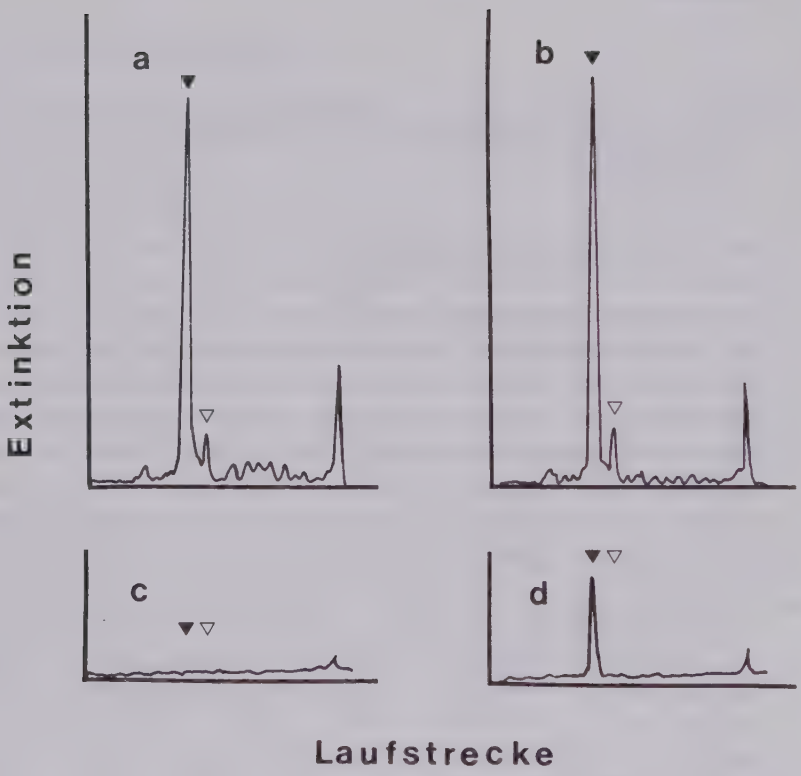


Abb. 1: Autoradiogramm (densitometrische Darstellung) der endogenen Phosphorylierung (1 min.) von Ultraschallhomogenaten a) mit Trypsin behandelter Zellen, b) unbehandelter Zellen. Endogene Phosphorylierung (10 min.) intakter Zellen c) nach 10 min. Trypsinbehandlung, d) ohne Behandlung. ▼ pp 135, ▽ pp 105.

Trypsin behandelten und unbehandelten intakten Zellen wurde mit 40 µl (= 40 µCi) γ^{32}P-ATP in GZPP für 10 min bei 37°C unter Schütteln endogen phosphoryliert. Nach Trypsinisierung ließen sich die beiden Phosphoproteine nicht mehr endogen phosphorylieren (Abb. 1c und d). Bereits früher wurde sichergestellt, daß dabei beide Phosphoproteine von der Zelloberfläche abgebaut werden (35).
Der Rest der Zellen wurde ultrabeschallt (3 x 5 sec, Mikrotip Stufe 3). Je 60 µl der Ultraschallhomogenate wurden für 1 min. bei 37°C mit je 40 µl (= 40 µCi) γ^{32}P-ATP inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden durch 5 minütige Inkubation bei 100°C mit einer SDS-β-Me-haltigen Lösung abgestoppt und weiterbehandelt wie in Material und Methoden beschrieben.

Die endogenen Phosphorylierungen der Ultraschallhomogenate ergaben einen nur geringfügig kleineren Wert für pp 135 und pp 105 im Fall der Trypsin behandelten Zellen (Abb. 1a und b). Die Hauptmenge (>90 %) an phosphorylierbarem pp 135 und pp 105 ist demnach intrazellulär und nicht auf der Zelloberfläche gelegen. Die Identität der unterschiedlich lokalisierten pp 135 und pp 105 wird in Kap. 5.1. gezeigt. Zur Ermittlung einer Fraktion, die reich an endogen phosphorylierbarem pp 135 und pp 105 ist, wurde eine subzelluläre Fraktionierung vorgenommen.

2.2. Aufschluß der Zellen

Es lassen sich im wesentlichen vier Typen des Zellaufschlusses entsprechend der angewandten Kräfte unterscheiden.
a. Mechanische b. Flüssigkeits- c. Gas-scherkräfte (N_2-Dekompression) d. osmotische Lyse (54).

Um die Intaktheit der subzellulären Organellen zu erhalten, ist es notwendig, die Zellen schonend aufzuschließen. Es werden daher zumeist Flüssigkeitsscherkräfte, seltener Gas-

scherkräfte angewandt. Die Homogenisation nach Potter-Elvehjem oder die nach Dounce, welche teilweise in dieser Arbeit benutzt wurde, basiert auf Flüssigkeitsscherkräften. Routinemäßig wurden die Zellen in dieser Arbeit jedoch mit Hilfe von Gasscherkräften aufgeschlossen. Die ursprünglich von Hunter und Commerford (55) eingeführte Methode der Stickstoffdekompression als Mittel des Zellaufschlusses beruht auf der Gleichgewichtseinstellung einer gerührten Zellsuspension mit Sauerstoff-freiem Stickstoff bei Drucken zwischen 20 und 65 atm für 15-20 min. (54).

Der Zellbruch erfolgt durch plötzliche Druckentspannung entweder dadurch, daß sich Gas innerhalb der Zelle expandiert oder durch Scherkräfte der sich schnell bildenden Gasbläschen in der die Zelle umgebenden Flüssigphase.

Die Stickstoffdekompression hat eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Flüssigkeitsscherkräfte nutzenden Methoden:

a) der Aufschluß erfolgt in einer inerten Atmosphäre,
b) lokale Erhitzung wird vermieden,
c) über einen großen Bereich Unabhängigkeit von der Zellkonzentration,
d) das Quellen subzellulärer Organellen kann durch Verwendung isotoner Puffer vermieden werden.

Der Hauptnachteil dieser Methode ist die starke Schaumbildung bei der Dekompression (54, 56).

Für einen Routine- Aufschluß wurden 16 x 500 ml STU 51A-232B Suspensionszellen mit einer Zelldichte zwischen 2 - 3 x 10^6 Zellen/ml 5 min bei 500 g in 250 ml Bechern abzentrifugiert (Stock). Alle folgenden Schritte wurden in der Kälte (4^oC) vorgenommen. Die Zellen wurden 2 x mit Puffer A (5 mM Tris·Cl pH 7.4 (4^oC), 0.25 M Saccharose, 0.2 mM $MgSO_4$) (54) in 8 x 80 ml Bechern gewaschen (5 min, 500 g, Stock) und dann in 200 ml Puffer A suspendiert. Unter Rühren der Zellsuspension in einem 250 ml Becherglas wurde 20 min bei 65 atm mit Stickstoff gesättigt. Nach Dekompression wurde das

Homogenat mit dem Serinproteaseinhibitor Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (57) auf 0.1 mM gebracht und ca. 5 min. langsam gerührt, um den gebildeten Schaum etwas aufzulösen. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden über 95 % der Zellen aufgeschlossen.

2.3. Grobe Zellfraktionierung

Die Auftrennung des Zellhomogenats nach N_2-Dekompression wurde durch eine fraktionierte Zentrifugation bei 1000 g und 143 000 g vorgenommen (Abb. 2).

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, wurden dabei drei subzelluläre Hauptfraktionen erhalten: eine Kernfraktion (ca. 10 % des Gesamtproteins), eine Membranfraktion (ca. 34 % des Gesamtproteins), welche die verbleibenden Zellorganelle enthielt,

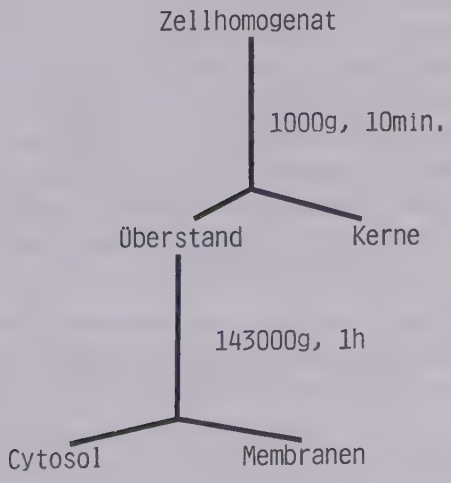


Abb. 2: Fraktionierte Zentrifugation des Zellhomogenats nach N_2-Dekompression

und eine Zellorganell-freie Cytosolfraktion (ca. 56 % des Gesamtproteins). Die Verteilung der Phosphoproteine auf diese drei subzellulären Hauptfraktionen wurde im folgenden untersucht.

2.4. Einfluß der Mg^{2+}-Konzentration auf die Verteilung der endogenen phosphorylierbaren Phosphoproteine

Divalente Kationen (Mg^{2+}, Ca^{2+}) werden beim Zellaufschluß zur Stabilisierung der Kerne zumeist in Konzentrationen von ein bis mehrere mM eingesetzt. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß für eine folgende Reinigung der Phosphoproteine die Mg^{2+}-Konzentration bei der subzellulären Fraktionierung auf 0.2 mM gesenkt werden mußte. Bei höherer Mg^{2+}-Konzentration (1 mM) erfolgte eine Assoziation der beiden Phosphoproteine pp 135 und pp 105 mit den Kernen und Membranen, vermutlich über Mg^{2+}-Phosphat-Brücken (Abb. 3). Bei niedrigerer Mg^{2+}-Konzentration (0.2 mM) fand sich der Hauptteil der beiden Phosphoproteine im Zellorganell-freien Cytosol, welches unter diesen Bedingungen als das geeignetste Ausgangsmaterial für eine weitere Reinigung der Phosphoproteine benutzt werden konnte. Die Verteilung der endogen phosphorylierten Phosphoproteine auf die jeweiligen subzellulären Fraktionen bei unterschiedlicher Mg^{2+}-Konzentration (0.2 mM und 1 mM) wurde im Autoradiogramm nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben verglichen (Abb. 3).

Auf die Bedeutung divalenter Kationen beim Umgang mit Phosphoproteinen wird im Kapitel 5.4. noch näher eingegangen.

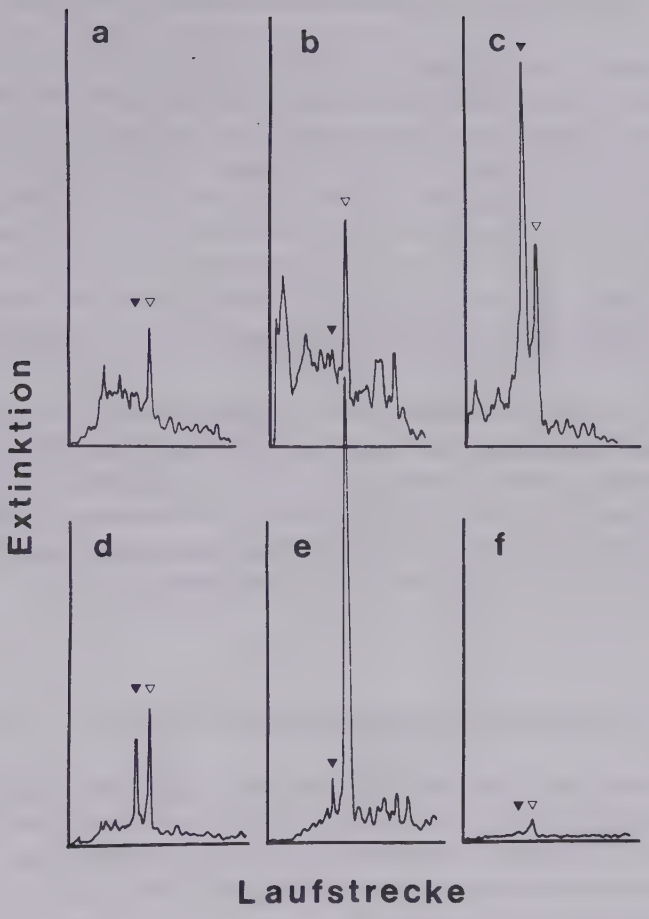


Abb. 3: Autoradiogramm (densitometrische Darstellung) der endogen phosphorylierten Zellfraktionen (50 µg Protein)
a,d: Kerne; b,e: Membranen; c,f: Cytosol
nach Fraktionierung in 0.2 mM $MgCl_2$ (a-c) und 1 mM $MgCl_2$ (d-f). Aufgetrennt wurden jeweils ca. 10 µg Protein. ▼ pp 135, ▽ pp 105.

3. Isolierung der Phosphoproteine pp 105 und pp 135

Es wurde in verschiedenen früheren Arbeiten versucht, die endogene Phosphorylierung von Zelloberflächenkomponenten in Verbindung zu bringen a) mit dem Transport von Stoffen durch die Zellmembran (58, 37), b) mit der Zellproliferation (59), c) der Zellaggregation (38), d) Zelltransformation (22, 48) und e) der Zelladhäsion (49). In keinem der Fälle gelang es jedoch, einen Einblick in das molekulare Geschehen zu geben, so daß die Funktion(en) der endogenen Zelloberflächenphosphorylierung nach wie vor ungeklärt bleiben.

Eine Isolierung der Phosphoproteine ist daher sinnvoll, da molekulare Eigenschaften am gereinigten Protein leichter ermittelt werden können. Ferner ist es möglich, gegen die gereinigten Komponenten monospezifische Seren zu produzieren, die es erlauben, weitere biochemische und biologisch funktionelle Untersuchungen durchzuführen.

3.1. Nachweis der Phosphoproteine

Bei jeder Proteinreinigung muß sich die Anreicherung eines Proteins verfolgen lassen. Da eine biologische oder enzymatische Aktivität nicht bekannt waren, wurde als spezifischer Nachweis Phosphorylierbarkeit in Verbindung mit dem Molekulargewicht gewählt.

Zur Erkennung Phosphoprotein-haltiger Fraktionen lassen sich prinzipiell zwei Strategien verfolgen. Nach der einen Strategie wird jede Fraktion im Verlauf der Reinigung nachträglich mit γ^{32}P-ATP phosphoryliert und als Leitmarkierung vor Beginn der Reinigung zugesetzt. Nach Identifizierung Phosphoprotein-haltiger Fraktionen muß in beiden Fällen über SDS-Gelelektrophorese sichergestellt werden, daß die gesuchten Phosphoproteine enthalten sind. In der vorliegenden Arbeit wurde letztere Strategie gewählt, da diese weit

weniger zeitaufwendig schien und zumal der Einsatz einer gereinigten Proteinkinase, die zu dem damaligen Zeitpunkt noch nicht vorlag, entfiel. Für die Vorabmarkierung der Phosphoproteine konnten die im cytosolischen Ausgangsmaterial endogen enthaltenen Proteinkinasen genutzt werden. Die mit dieser Strategie verbundenen Schwierigkeiten werden im folgenden behandelt.

3.2. Kriterien der endogenen Cytosolphosphorylierung

Voraussetzung für den Nachweis Phosphoprotein-haltiger Fraktionen ist eine genügend hohe Markierung der Phosphoproteine mit ^{32}P. Es wurde daher einerseits nach optimalen endogenen Phosphorylierungsbedingungen gesucht, andererseits mit Hilfe von Phosphataseinhibitoren versucht, die ^{32}P-Markierung stabil in den Phosphoproteinen zu erhalten.

3.2.1. Mg^{2+}-Fällbarkeit der Phosphoproteine

Die meisten Proteinkinasen benötigen als Cosubstrat das zweiwertige Kation Mg^{2+} in optimalen Konzentrationen von 5-10 mM (10). Da bei der subzellulären Fraktionierung (Kapitel 2.3.) ein Einfluß der Mg^{2+}-Konzentration auf die Verteilung der endogen phosphorylierbaren Phosphoproteine festgestellt worden war, wurde im folgenden die Kopräzipitation der Phosphoproteine, welche die Anreicherung derselben erschweren würde, in Abhängigkeit von der Mg^{2+}-Konzentration untersucht. Zur Pufferung der endogenen Phosphorylierung wurde das häufig dafür empfohlene Tris-Puffer-System gewählt.

Nach endogener Phosphorylierung von 5 ml Cytosol (0.2 mM Mg^{2+}) in 0.1 M Tris·Cl pH 8.5 mit 200 µl $\gamma^{32}P$-ATP (= 200 µCi) für 5 min. bei 37°C wurde die

Reaktion mit 250 µl 50 mM p-Chloromercuriphenylsulfonat (siehe Kapitel 3.24.) abgestoppt. Jeweils 900 µl Reaktionsansatz wurden mit 100 µl $MgCl_2$ auf die entsprechende Mg^{2+} Konzentration gebracht. Nach 15-minütiger Inkubation wurde 20 min. bei 22 000 g abzentrifugiert. Der Niederschlag und Überstand wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und der ^{32}P-Einbau, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt.

Unter den angegebenen Phosphorylierungsbedingungen erfolgte praktisch kein ^{32}P-Einbau in pp 105 (siehe Kapitel 3.22.). Es wurde daher nur der ^{32}P-Einbau in pp 135 ausgewertet (Tab. 3).

Tabelle 3: Fällbarkeit von pp 135 in Tris-Puffer mit steigender Konzentration an Mg^{2+}

Mg^{2+}-Konz. (mM)	pp 135 Präzipitat/Gesamt pp 135 in %
0.2	1.7
1	6.5
3	42.7
5	73.4
7	89.9
10	95.5

Da einerseits bei höherer Mg^{2+} Konzentration zumindest eine Ausfällung von pp 135 erfolgte, andererseits aber bei niedrigeren Mg^{2+} Konzentrationen kein hinreichend hoher Einbau von ^{32}P in pp 105 zu erzielen war, mußte nach einem anderen Puffersystem gesucht werden. Es wurde ein Phosphatpuffer gewählt, da zu erwarten war, daß die frei in Lösung befindlichen Phosphationen, ähnlich denen im Phosphoprotein, die Mg^{2+} Ionen zu komplexieren vermögen. Eine Ausfällung

von Magnesiumphosphat erfolgte bei der angewandten Phosphatkonzentration von 50 mM und einer Magnesiumkonzentration bis 10 mM nicht. Eine Probe der cytosolischen Fraktion wurde entsprechend den oben angegebenen Bedingungen in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.8 (37°C) mit 1 mM Mg^{2+} bzw. 10 mM Mg^{2+} endogen phosphoryliert und wie oben beschrieben weiterbearbeitet. Auf Grund der weitaus besseren endogenen Phosphorylierbarkeit von pp 105 in diesem Puffersystem konnte der ^{32}P-Einbau in beide Phosphoproteine ausgewertet werden (Tab. 4).

Tabelle 4: Mg^{2+}-Präzipitation von cytosolischem pp 135 und pp 105 in Phosphat-Puffer

Mg^{2+}-Konz. (mM)	präzipitiertes pp 135 (%)	präzipitiertes pp 105 (%)
1	2.7	1.7
10	12.7	7.2

Im folgenden wurde mit 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.8 weitergearbeitet, da 1. ein guter Einbau von ^{32}P in beide Phosphoproteine erzielt werden konnte und 2. nur eine geringfügige Kopräzipitation erfolgte.

3.2.2. Abhängigkeit der endogenen Phosphorylierung von der Mg^{2+}-Konzentration

Enzymatische Phosphorylierungsreaktionen laufen in der Regel nur in Anwesenheit divalenter Kationen ab. Zur Ermittlung optimaler Phosphorylierungsbedingungen wurden 25 µl Cytosol endogen 1 min. mit 15 µCi $\gamma^{32}P$-ATP in einem Gesamtvolumen von 50 µl 50 mM Natriumphosphat pH 7.8 in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration phosphoryliert (Tab. 5).

Tabelle 5: Prozentualer Phosphateinbau in pp 135 und pp 105 bezogen auf die Phosphateinbausumme beider Phosphoproteine in Abhängigkeit von der Mg^{2+}-Konzentration

Mg^{2+}-Konz. (mM)	pp 135 (%)	pp 105 (%)
1	87.9	12.1
3	78.6	21.4
5	75.2	24.8
7	68.5	31.5
10	49.8	50.2

Die Summe des Phosphateinbaus in die beiden Phosphoproteine pp 135 und pp 105 blieb in dem untersuchten Magnesiumkonzentrationsbereich von 1-10 mM annähernd gleich. Es wurde daher im folgenden mit 10 mM Mg^{2+} weitergearbeitet, da hierbei beide Phosphoproteine gleichermaßen gut phosphoryliert wurden.

3.2.3. Zeitabhängigkeit der endogenen Phosphorylierung

Der ^{32}P-Einbau in die beiden cytosolischen Phosphoproteine durchläuft in Abhängigkeit von der Zeit ein Maximum. Bei vorgegebener Menge an Phosphatdonor (ATP) überwiegt zu Beginn der endogenen Phosphorylierung der Einbau von ^{32}P durch Proteinkinasen. Mit der Erschöpfung des Phosphatdonors überwiegt dann die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen (60).

Zur Ermittlung des ^{32}P-Einbaumaximums in die beiden Phosphoproteine wurden 50 µl Cytosol mit 10 µl 500 mM Naphosphatpuffer pH 7.8 (37°C) und 10 µl 100 mM $MgCl_2$ 1 min. bei 37°C inkubiert. Die endogene Phosphorylierung

wurde mit 30 µl (= 30 µCi) γ^{32}P-ATP gestartet und nach verschiedenen Zeiten mit 10 µl einer SDS/β-Me haltigen Lösung durch 5-minütiges Erhitzen auf 100°C abgestoppt. Aliquote Teile wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Nach Autoradiographie des getrockneten Gels wurden die pp 105 und pp 135 Banden ausgeschnitten und der ^{32}P-Einbau bestimmt.

Das Maximum der endogenen Phosphorylierung beider Phosphoproteine wurde unter den angegebenen Bedingungen nach 5 min. durchlaufen (Abb. 4). Nach 3-stündiger endogener Phosphorylierung blieben nur noch 10-15 % des maximalen ^{32}P-Einbaus in pp 105 und pp 135 erhalten.

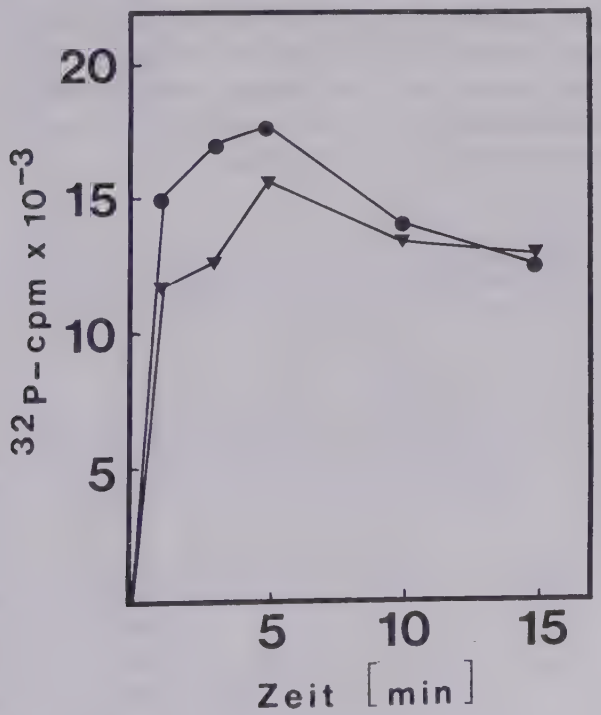


Abb. 4: Zeitabhängigkeit des ^{32}P-Einbaus in pp 105 (▼-▼) und pp 135 (●-●) bei endogener Phosphorylierung von Cytosol

3.2.4. Hemmbarkeit der Proteinphosphatasen

Da die cytosolische Fraktion eine relativ hohe Proteinphosphataseaktivität aufwies (Abb. 4), mußte zur Erhaltung der Phosphoproteinmarkierung nach geeigneten Inhibitoren gesucht werden. In Vorversuchen wurde eine Reihe bekannter Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit überprüft (46). Zusätzlich wurden verschiedene Thiolgruppen blockierende Agentien eingesetzt.

Die endogene Phosphorylierung wurde ähnlich wie in Kap. 3.2.3. durchgeführt. Nach 2-minütiger Inkubation wurde das Reaktionsgemisch entweder auf 1 mM an unmarkiertem ATP (Dephosphorylierung ohne Inhibitor) oder auf 1 mM an unmarkiertem ATP + Inhibitor gebracht. Die verzögerte Zugabe an Inhibitor war notwendig, da einige der Inhibitoren auch die Proteinkinasen hemmten. Nach einer weiteren Stunde wurden die Reaktionen abgestoppt. Die endogene Phosphorylierung einer 2-minütigen Inkubation ohne Nachinkubation galt als Kontroll-(100 %)wert.

Tabelle 6: ^{32}P-Markierung von pp 135 und pp 105 nach 1-stündiger endogener Dephosphorylierung in Anwesenheit von Inhibitoren in (%) der Kontrolle

Inhibitor	Konzentration (mM)	pp 135	pp 105
0-Kontrolle	-	100	100
1h-Kontrolle	-	20.3	19.3
NaF	10	25.9	16.8
PP_i	2	25.8	16.9
$ZnSO_4$	1	32.7	69.1
EDTA	10	26.6	15.2
Mersalyl	2	32	83.1
PHMB	2	128	40.6
DTNB	2	38.8	30.9
PCMPS	2	108	107
Jodacetamid	3	69.9	68

Als bester Inhibitor erwies sich das relativ hydrophile reversibel Thiolgruppen blockierende p-Chloromercuriphenylsulfonat (PCMPS) (61).

Weitere Dephosphorylierungsexperimente von pp 135 und pp 105 ergaben eine hinreichend gute Hemmung der Dephosphorylierung mit 1 µg PCMPS pro mg Protein (Cytosol) (Abb. 5).

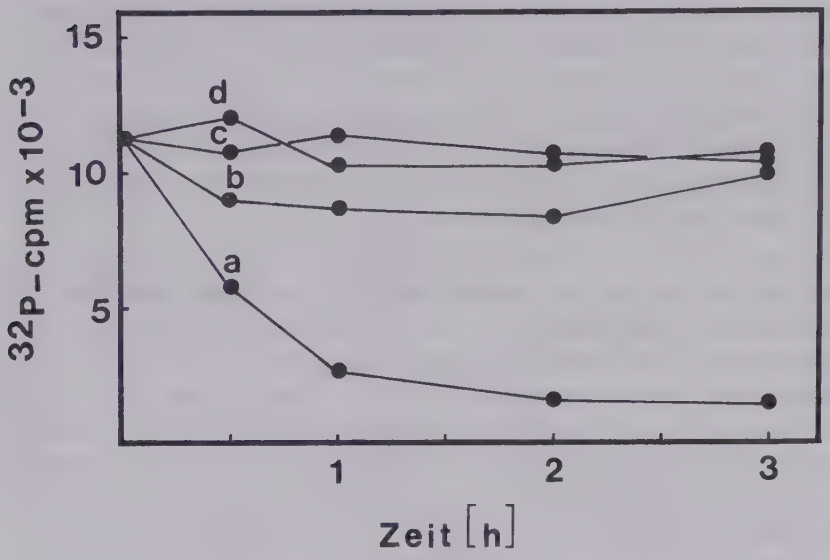


Abb. 5: Endogene cytosolische Dephosphorylierung von pp 135 in Anwesenheit von 0 (a), 1 (b), 3 (c) und 5 mM (d) PCMPS. Ein ähnlicher Verlauf ergab sich für pp 105 (Daten nicht abgebildet)

3.3. Chromatographische Verfahren zur Reindarstellung von pp 105 und pp 135

Bei der Reinigung eines Proteins nutzt man seine Eigenschaft wie Größe, Ladung, Hydrophobizität oder eine spezifische Affinität. In der Regel verwendet man in den ersten Reinigungsschritten Methoden hoher Kapazität (Fällungen, Ionenaustauschchromatographie), um große Proteinmengen und Volumen schnell zu reduzieren. Es folgen dann Schritte geringerer Kapazität, zumeist aber höherer Selektivität (Molekularsieb, Affinitätschromatographie etc.). In jedem Fall wird man versuchen, die Reinigungsschritte so anzuordnen, daß zeitaufwendiges Umdialysieren auf ein anderes Puffersystem (Ionenstärke) oder mit Materialverlust verbundenes Einengen oder Ausfällen entfallen.

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Phosphoproteine pp 105 und pp 135 nach einem ähnlichen Reinigungsschema angereichert. Beginnend mit einer fraktionierten Ammonsulfatfällung folgte eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose. Direkt anschließend wurde eine Chromatographie an Hydroxylapatit vorgenommen. Nach Elution mit einem Hochsalzpuffer wurde ohne zusätzliche Erhöhung der Ionenstärke eine hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose angeschlossen. Im Falle der pp 135-Fraktion folgte eine weitere Reinigung im präparativen SDS-Gel.

a.) Ammonsulfatfällung

Endogen phosphoryliertes (20 ml) und nicht phosphoryliertes Cytosol (400 ml) wurden getrennt fraktioniert mit Ammonsulfat gefällt. Da Ammonsulfat den pH in den sauren Bereich verschiebt, wurde durch Zusatz von 1/10 Volumen 1 M Tris·Cl pH 7.5 (R.T.) gepuffert. Die Fällung erfolgte bei 4°C durch Zugabe von festem Ammonsulfat. Bei 40 % Ammonsulfatsättigung (62) wurde das Proteinpräzipitat abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 70 % Ammonsulfatsättigung gebracht und erneut abzentrifugiert. Das Proteinpräzipitat, welches ca. 90 % der beiden Phosphoproteine enthielt, wurde in

Puffer B (50 mM Tris-SO_4, 0.1 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7.5, 4°C) aufgenommen und gegen denselben dialysiert.

b.) Chromatographie an DEAE-Sepharose

Der Anionenaustauscher DEAE-Sepharose (Diethylaminoethyl-Agarose) wurde mit Puffer B äquilibriert. Nach Auftrag des Dialysats wurde mit 3-5 Säulenvolumen Puffer B nachgewaschen. Mit einem ansteigenden Salzgradienten erfolgte schließlich die Elution der gebundenen Proteine (Abb. 6).

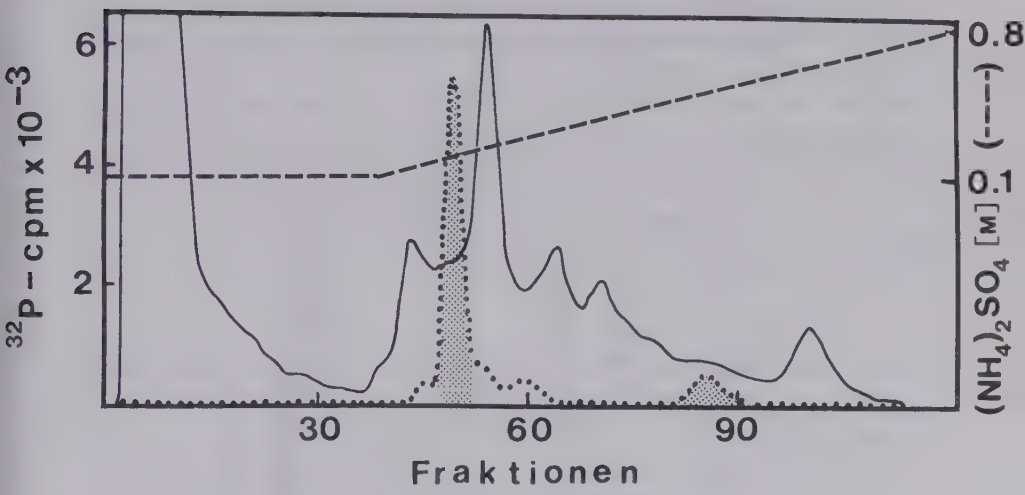


Abb. 6: Trennung des Ammonsulfat-Niederschlags (40-70 %) auf einer DEAE-Sepharose-Säule (1.8 x 48 cm). Fraktionen à 10 ml. ---- Ammonsulfatgradient; ——— Extinktion bei 280 nm; ···· ^{32}P in 50 µl Proben der Fraktionen. Punktierte Flächen: vereinte Fraktionen zur weiteren Reinigung

Die Elution von pp 135 zusammen mit den meisten anderen endogen phosphorylierbaren Phosphoproteinen erfolgte bei 0.2 M Ammonsulfat. pp 105 eluierte als einziges phosphory-

liertes Phosphoprotein erst bei 0.5 M Ammonsulfat, so daß eine gute Abtrennung von pp 135 erzielt werden konnte (Abb. 6).

c.) Chromatographie an Hydroxylapatit

Die Wechselwirkungen, welche Proteine mit Hydroxylapatit eingehen, sind weitestgehend ungeklärt (63, 64). Vermutlich spielen Bindungen an das divalente Calciumion eine maßgebliche Rolle. Eine besonders starke Wechselwirkung der Phosphoproteine über Calcium-Phosphat-Brücken war daher zu erwarten. Abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen kann nur mit Phosphatpuffer eluiert werden. Üblicherweise wird dabei in Stufen mit steigender Phosphatkonzentration eluiert, da die Proteine sehr stark nachschmieren. Nach direktem Auftrag der pp 105 und pp 135 haltigen Fraktionen auf jeweils eine Hydroxylapatitsäule erfolgten die in Abb. 7 und 8 angezeig-

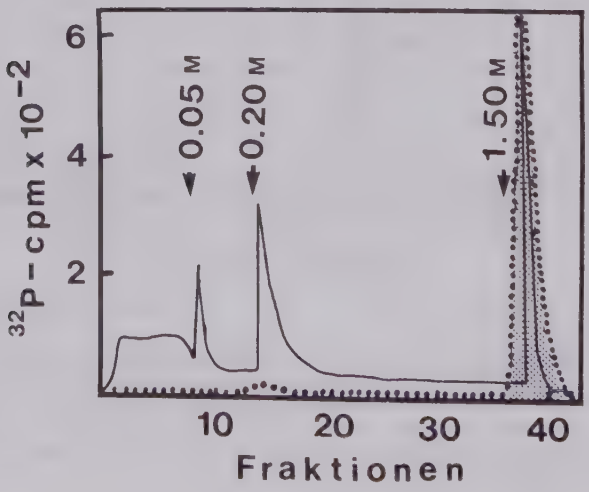


Abb. 7: Stufenweise Elution der DEAE-Sepharose Fraktionen pp 105 von einer Hydroxylapatit-Säule (1x15 cm) mit Kaliumphosphatpuffer pH: 7.0 (0.05 M, 0.2 M, 1.5 M). Fraktionen à 10 ml. —— Extinktion bei 280 nm; .... ^{32}P in 50 µl Proben der Fraktionen. Punktierte Fläche: vereinte Fraktionen zur weiteren Reinigung.

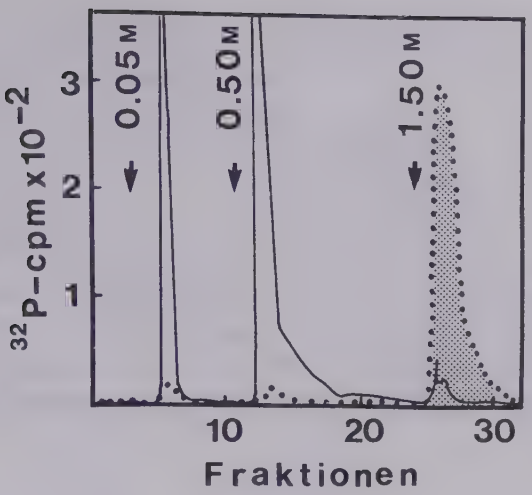


Abb. 8: Stufenweise Elution der DEAE-Sepharose Fraktionen pp 135 von einer Hydroxylapatit-Säule (1x15 cm) mit Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 (0.05 M, 0.5 M, 1.5 M). Fraktionen à 10 ml. ——— Extinktion bei 280 nm; .... ^{32}P in 50 µl Proben der Fraktionen. Punktierte Fläche: vereinte Fraktionen zur weiteren Reinigung.

ten Elutionsschritte. In Vorversuchen wurde der Beginn der Elution von pp 105 bei 0.3 M K-Phosphat pH 7.0, die von pp 135 bei 0.6 M K-Phosphat pH 7.0 ermittelt. Nach geeigneten Vorelutionen (Abb. 7 und 8) wurde in beiden Fällen pp 105 und pp 135 direkt mit 1.5 M K-Phosphat pH 7.0 eluiert, um durch die Elution mit hohem Salz eine direkt anschließende Bindung der Phosphoproteine an Phenylsepharose zu ermöglichen.

d.) Chromatographie an Phenylsepharose

Bei der nicht-ionischen Adsorptionschromatographie oder Aussalzchromatographie an Phenylsepharose spielen neben hydrophoben Wechselwirkungen π-π-Wechselwirkungen mit dem Phenylrest eine große Rolle (65). Solche Wechselwirkungen nehmen mit steigender Ionenstärke im Lösungsmittel zu. Nach

dem jeweiligen Auftrag der pp 105 und pp 135 haltigen Hydroxylapatitfraktion wurde mit absteigender Ionenstärke eluiert (Abb. 9 und 10). PP 105 eluierte bei 0.7 M Kaliumphosphat pH 7.0 und war nach Auftrennung im SDS-Gel und Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 nach Abschätzung zu >95 % rein (Abb. 11e).

PP 135 eluierte mit einer Anzahl anderer phosphorylierbarer Phosphoproteine in einem relativ breiten Salzkonzentrationsbereich (0.5 - 0.1 M). Da eine weitere Reinigung von pp 135 durch andere säulenchromatographische Verfahren bislang nicht möglich war, wurde eine Endreinigung mit Hilfe der präparativen SDS-Gelelektrophorese angeschlossen.

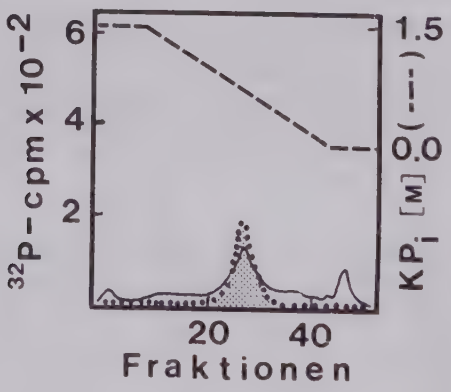


Abb. 9: Trennung der pp 105 haltigen Hydroxylapatit-Fraktionen auf einer Phenylsepharose-Säule (1x20 cm) mit absteigendem Salzgradienten (----). Fraktionen à 5 ml. —— Extinktion bei 280 nm; .... ^{32}P in 50 µl Proben der Fraktionen. Punktierte Fläche: pp 105 haltige Fraktionen

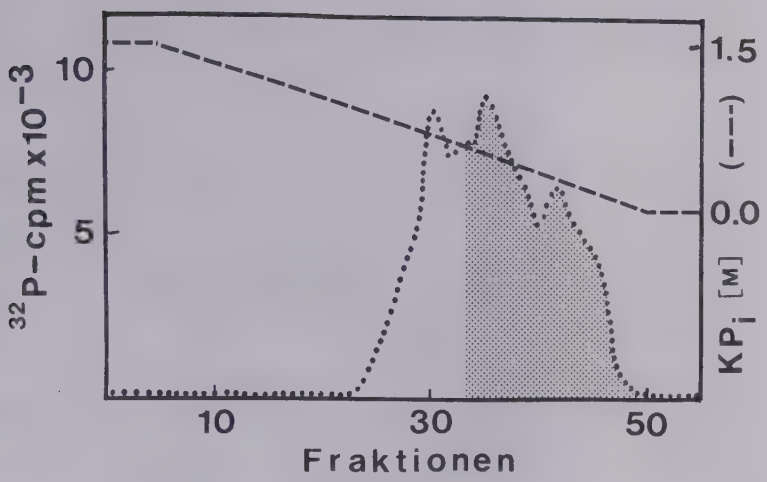


Abb. 10: Trennung der pp 135 haltigen Hydroxylapatit-Fraktionen auf einer Phenylsepharose-Säule (1x20 cm) mit absteigendem Salzgradienten (----). Fraktionen à 5 ml. .... ^{32}P in 50 µl Proben der Fraktionen. Punktierte Fläche: vereinte Fraktionen zur weiteren Reinigung.

e.) Präparative SDS-Gelelektrophorese zur Reinigung von pp 135

pp 135 haltige Hydroxylapatitfraktionen wurden gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde 5 min. bei 100°C in SDS/β-Me-haltigem Puffer inkubiert und anschließend auf präparativen SDS-Gelen nach der Methode von Lämmli (66) aufgetrennt. Nach kurzer Anfärbung der Gele mit 1 %iger wässriger Coomassie Blue Brilliant R250 Lösung und Entfärbung in Wasser wurden die pp 135 haltigen Banden ausgeschnitten und nach der Methode von Mendel-Hartvig (67) ohne SDS eluiert.

SDS-gelelektrophoretische Auftrennung des Eluats ergab zwei Banden mit 135 KD und 125 KD (Abb. 12c). Da die phosphorylierbare Komponente mit 125 KD erst im Verlauf der säulenchromatographischen Reinigung auftrat und nach partieller

Abb. 11

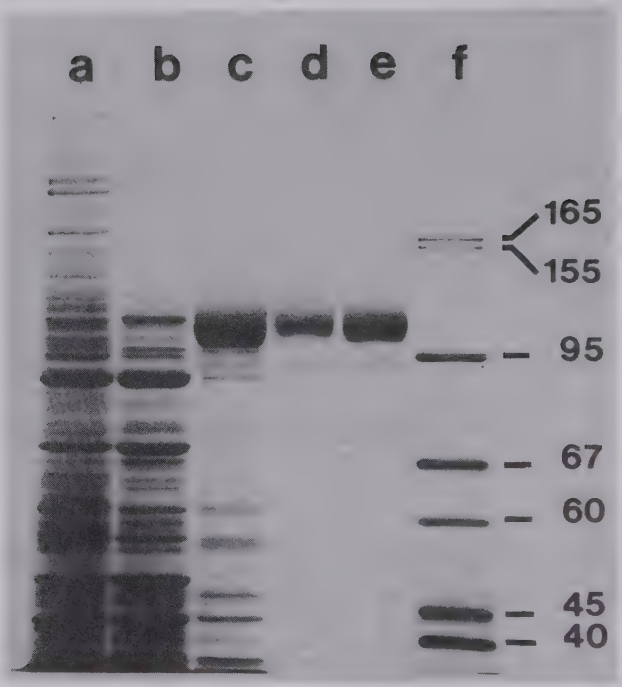
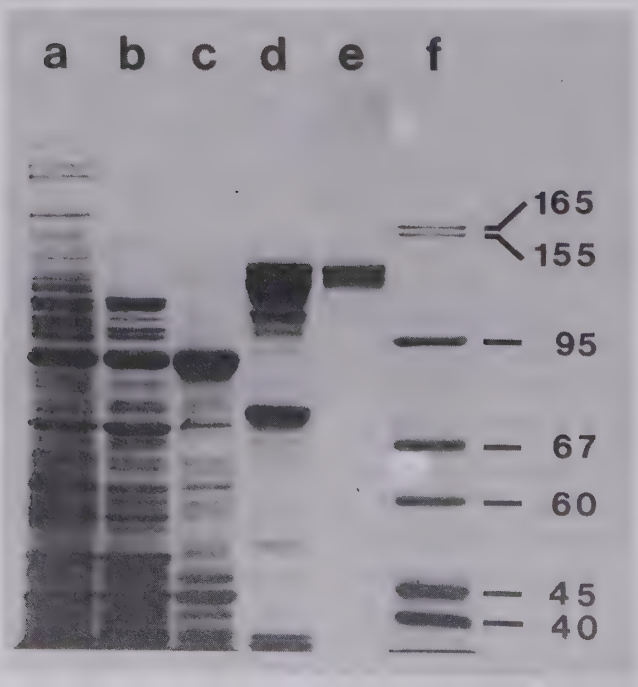


Abb. 12



proteolytischer Spaltung mit V8-Protease ein identisches Phosphopeptidmuster mit pp 135 ergab, handelt es sich bei pp 125 vermutlich um ein Abbauprodukt.

f.) Reinigungstabelle

Die im Verlauf der Reinigung von pp 105 und pp 135 erhaltenen Zwischenfraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt (Abb. 11 und 12). Die jeweils erhaltenen Ausbeuten und Anreicherungsfaktoren sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Reinigungstabelle. Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten von cytosolischem pp 105 und pp 135 für die einzelnen Reinigungsschritte. Die Berechnungen basieren auf dem ^{32}P-Einbau in pp 105 (pp 135)/mg Gesamtprotein in einer Fraktion.

Reinigungsschritt	Reinigungsfaktor pp 105	Reinigungsfaktor pp 135	% Ausbeute pp 105	% Ausbeute pp 135
Cytosol	1	1	100	100
40-70 % Ammonsulfat	2.5	3.7	74	92
DEAE-Sepharose	143	35	49	36
Hydroxylapatit + Phenylsepharose	384	1535	35	23
präparative SDS-Gelelektrophorese	-	ca.3000[x]	-	n.b.

[x]Anreicherung nach Coomassie Brilliant Blue R250 Anfärbbarkeit abgeschätzt.

n.b. nicht bestimmt

Abb. 11 u. 12: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (7.5%) von Fraktionen der Reinigungsschritte für pp 105 (Abb. 11) und pp 135 (Abb. 12), Coomassie Brilliant Blue R250 Färbung.
a) Cytosol; b) Ammonsulfatpräzipitat (0-40%) c) DEAE-Sepharose; Abb. 11: d) Hydroxylapatit; e) Phenylsepharose; Abb. 12: d) Hydroxylapatit +Phenylsepharose; e) Präparative SDS-Gelelektrophorese. f) Molekulargewichtsmarker: RNA-Polymerase β' (165000), β (155000); Phosphorylase a (95000); Rinderserumalbumin (67000); Katalase (60000); Ovalbumin (45000); Aldolase (40000).

Der prozentuale Anteil an den cytosolischen Proteinen beträgt somit für pp 105 ca. 0.2 %, für pp 135 ca. 0.03 %.

4. Isolierung einer cytosolischen Phosvitinkinase

Die auf der Zelloberfläche lokalisierten Phosphoproteine pp 105 und pp 135 sind auch durch endogene Phosvitinkinasen phosphorylierbar (35).

Es wurde daher in dieser Arbeit die Isolierung einer cytosolischen Phosvitinkinase zunächst mit der Absicht begonnen, ein definiertes Phosphorylierungsreagenz der Phosphoproteine zu erhalten.

Phosvitinkinasen, die häufig auch als Caseinkinasen bezeichnet werden, sind aus ein oder mehreren Untereinheiten aufgebaute Phosphotransferasen geringer Substratspezifität. Von den üblicherweise eingesetzten künstlichen Substraten werden bevorzugt Phosvitin und Casein phosphoryliert. Phosvitinkinasen sind unabhängig von cyclischen Nukleotiden und akzeptieren neben ATP auch GTP als Phosphatdonor. Ihre Regulation und biologische Funktion in der Zelle sind weitestgehend ungeklärt (10).

4.1. Testsystem

Der Nachweis einer Enzymaktivität im Verlauf der Reinigung sollte schnell und einfach auszuführen sein. Proteinkinaseaktivitäten lassen sich leicht durch Einbau von ^{32}P in ein geeignetes Substratprotein messen. Voraussetzung hierfür ist die Abtrennung des markierten Proteins vom ebenfalls im Reaktionsansatz befindlichen $\gamma\,^{32}P$-ATP und ^{32}P. Dies kann entweder durch Bindung der Proteine an Filterpapierchen erreicht werden (68) oder durch eine Trichloressigsäurefällung der Proteine mit anschließender Zentrifugation (6) oder

Filtration (69) des Präzipitats.

In dieser Arbeit wurde ein Filtrationstest mit Phosvitin als Substrat durchgeführt.

Das Puffersystem der endogenen cytosolischen Phosphorylierung wurde beibehalten (Kap. 3.23.). Die ATP und Proteinsubstratkonzentration wurde in einen üblichen Konzentrationsbereich gelegt. Der Phosphateinbau in Phosvitin verhielt sich zu der Enzymmenge linear bis ca. 70 pmol Phosphat/100 µg Phosvitin. Bei einer im Test durchgeführten Inkubationszeit von 5 min. lagen die meisten Proben der im Verlauf der Aufarbeitung durchgetesteten Fraktionen im linearen Bereich.

4.2. Verfahren zur Reindarstellung einer Phosvitinkinase

a.) Ammonsulfatfällung

Zunächst wurde durch Ammonsulfatfällungen bei unterschiedlicher Sättigung entsprechend der Vorschrift in 3.3a der Prozentsatz fällbarer Phosvitinkinasen ermittelt (Tab. 8).

Tabelle 8: Phosvitinkinaseaktivität (PKA) der Ammonsulfatpräzipitate unterschiedlicher Sättigung in (%) der gesamten cytosolischen PKA

Ammonsulfatsättigung (%)	PKA im Präzipitat/PKA gesamt (%)
35	61.8
40	78.4
45	90.8
50	93.6

Da bei 40 % Ammonsulfatsättigung ca. 80 % der Phosvitinkinaseaktivität gefällt werden konnten, wurde für die weitere Reinigung der 40 % Ammonsulfatniederschlag, welcher bei der fraktionierten Ammonsulfatfällung der Phosphoproteine anfiel, verwendet.

b.) DEAE-Sepharose

Das Ammonsulfatpräzipitat (40 %) wurde in Puffer C (25 mM Tris-Cl pH 7.5 (4^{o}C) aufgenommen und gegen diesen dialysiert. Nachdem von ausgefallenem Protein abzentrifugiert worden war, wurde das Dialysat auf DEAE-Sepharose aufgetragen. Es wurde mit 3-5 Säulenvolumen nachgewaschen und schließlich mit einem linear ansteigenden Salzgradienten eluiert (Abb. 13).

Von den drei erkennbaren Phosvitinkinaseaktivitäten wurden nur die beiden in Abb. 12 punktiert hervorgehobenen im Salzgradienten zwischen 0.2 und 0.4 M NaCl eluierbaren Aktivitäten weiter gereinigt (Abb. 13).

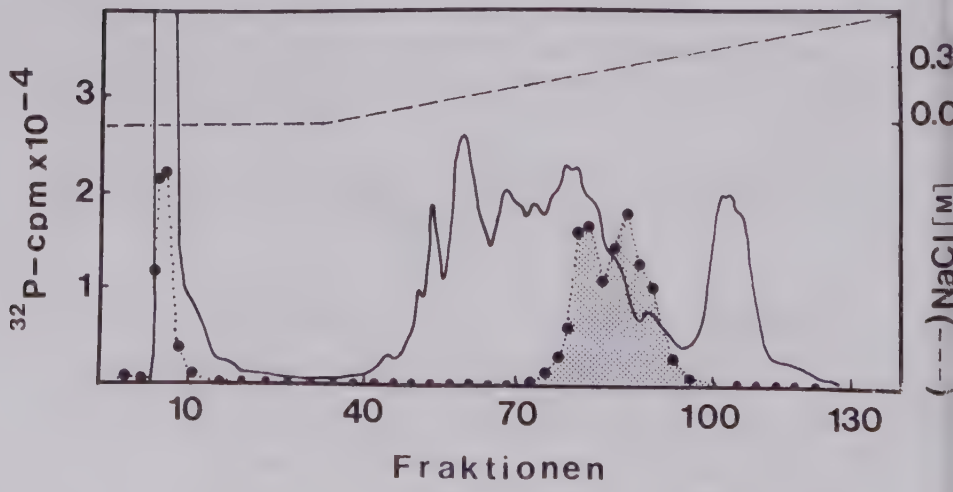


Abb. 13: Trennung des Ammonsulfatniederschlags (40 %) auf einer DEAE-Sepharose-Säule (1.8x48 cm). Fraktionen à 10 ml. ---- NaCl-Gradient; —— Extinktion bei 280 nm; .... Phosvitinkinaseaktivität (^{32}P). Punktierte Fläche: vereinte Fraktionen zur weiteren Reinigung.

c.) Phosphocellulose

Phosphocellulose kann mit Erfolg zur Reinigung einer Vielzahl von Proteinkinasen eingesetzt werden (70). Die hohe Affinität vieler Proteinkinasen zu Phosphocellulose ist vermutlich auf eine partielle Strukturgleichheit mit dem Cosubstrat ATP zurückzuführen.

Nach Auftrag der Phosvitinkinase-haltigen Elutionsfraktionen der DEAE-Sepharose wurde mit Puffer C nachgewaschen. Die Elution der gebundenen Phosvitinkinasen erfolgte mit einem linear ansteigenden Salzgradienten (Abb. 14).

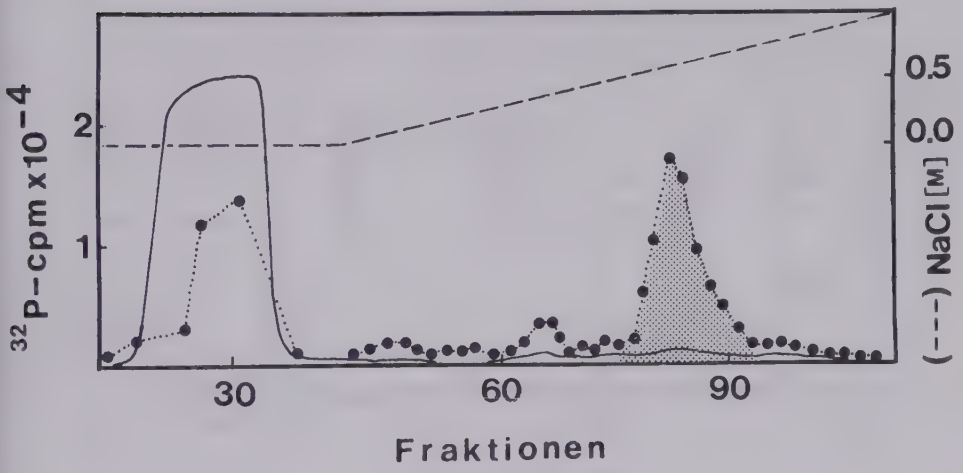


Abb. 14: Elution der vereinten DEAE-Sepharose-Fraktionen von einer Phosphocellulose-Säule (2.3 x 43 cm). Fraktionen à 10 ml. ---- NaCl-Gradient; —— Extinktion bei 280 nm; •••• Phosvitinkinaseaktivität (^{32}P). Punktierte Fläche: vereinte Fraktionen zur weiteren Reinigung.

d.) Phosvitinsepharose

Die Bioaffinitätschromatographie nutzt spezifische biologische Wechselwirkungen zwischen Molekülen (71). Durch Kopplung von Phosvitin an einen festen Träger (Sepharose 4B) konnte diese Methode zur Reinigung von Phosvitinkinase angewandt werden.

Die Phosvitinkinase-haltigen Elutionsfraktionen der Phosphocellulose wurden auf eine mit Puffer C äquilibrierte Phosvitinsepharosesäule aufgetragen. Nachdem mit Puffer C nachgewaschen worden war, wurde in Stufen mit ansteigender Phosphationenkonzentration eluiert (Abb. 15).

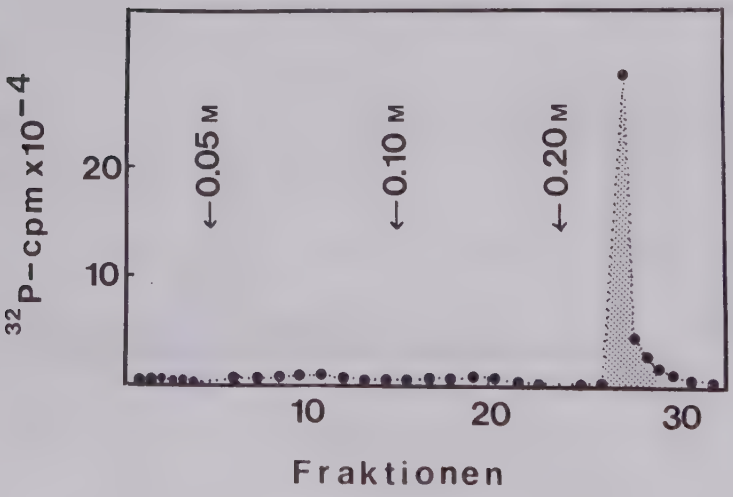


Abb. 15: Stufenweise Elution der Kinaseaktivität von einer Phosvitinsepharose-Säule (1 x 20 cm) mit Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 (0.05 M, 0.1 M, 0.2 M).
···· Phosvitinkinaseaktivität (^{32}P). Punktierte Fläche: vereinte Fraktionen.

Bei 0.2 M Kaliumphosphat pH 7.0 konnte die gesamte Phosvitinkinaseaktivität eluiert werden. Von der so erhaltenen Fraktion wurde die folgende Charakterisierung vorgenommen.

4.3. Charakterisierung der gereinigten Phosvitinkinase

Im 7.5 % SDS-Gel erhielt man im wesentlichen drei Hauptkomponenten mit einem Molekulargewicht von 42000, 38000 und 24000 Dalton (Abb. 15). Ein Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Caseinkinasen ergab eine gute Übereinstimmung mit der Typ II Caseinkinase, die aus 4 Untereinheiten $\alpha\alpha'\beta_2$ aufgebaut ist (Tab. 9).

Tabelle 9:

Herkunft	Monomeres Molekulargewicht	Lit.
Novikoff Ascites Tumorzellen	44 000 (α) 40 000 (α') 26 000 (β)	(72)
Rattenleber	42 000 (α) 39 000 (α') 26 000 (β)	(73)
Kaninchenretikulozyten	42 000 (α) 38 000 (α') 24 000 (β)	(74)
SV40 transformierte Mäusefibroblasten	42 000 (α) 38 000 (α') 24 000 (β)	eigene Ergebnisse

Eine 1-stündige Autophosphorylierung der isolierten Phosvitinkinase unter den üblichen Phosphorylierungsbedingungen führte zu einem bevorzugten ^{32}P-Einbau in die β-Unterschicht (Abb. 16). Die quantitative Auswertung des ^{32}P-Einbaus in die Untereinheiten der Phosvitinkinase ist in Tab. 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: ^{32}P-Einbau in die Monomere nach Autophosphorylierung der Phosvitinkinase in (%) des gesamten ^{32}P-Einbaus

α:	4.7
α':	9.2
2Xβ:	86.1

Der nahezu ausschließliche Einbau von ^{32}P in die β-Untereinheit entsprach ebenfalls den Angaben der Literatur (72, 74). Möglicherweise spielt die Caseinkinase II eine Rolle bei der Phosphorylierung der eukaryontischen Initiationsfaktoren elF-2, elF-3, elF-4B und elF-5 (75, 76).

Abb. 16: SDS-Polyacrylamidgel (10 %) der gereinigten Phosvitinkinase .
b) Coomassie Brilliant Blue R250 Färbung
c) Autoradiogramm von b) nach 1-stündiger Autophosphorylierung
a) Molekulargewichtsmarker:
Phosphorylase a (95000), Rinderserumalbumin (67000), Katalase (60000), Ovalbumin (45000), Aldolase (40000), Chymotrypsinogen A (25500).

Abb. 17: SDS-Polyacrylamidgel (15 %) der Phosphopeptide (Autoradiographie) von cytosolischem und Oberflächen-pp 105 und pp 135 nach 30-minütiger Behandlung mit steigenden Mengen V8 Protease (a.-f.: 0.1, 20, 200, 400, 2000 ng).

Abb. 19: Polyacrylamidgel (7.5 %) ohne SDS von gereinigtem pp 105. Coomassie Brilliant Blue R250 Färbung.
M: Monomer, D: Dimer.

Abb. 17

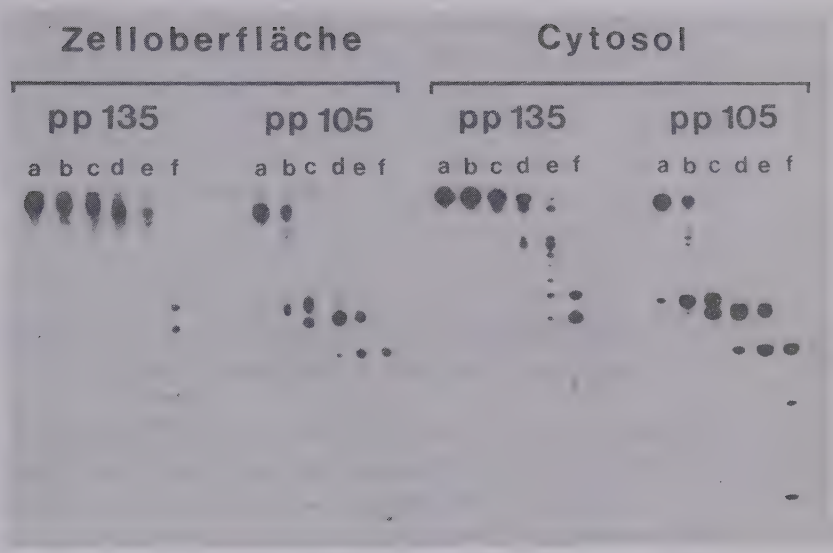


Abb. 16

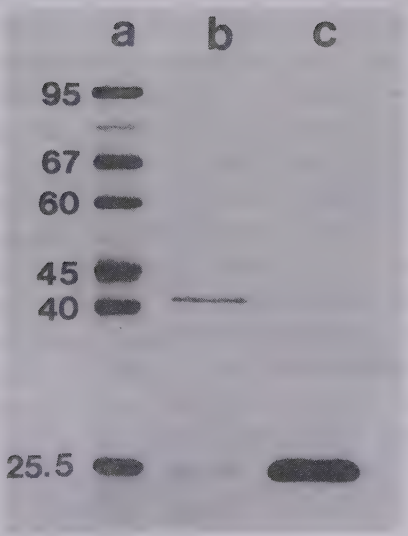
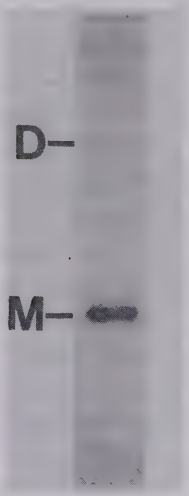


Abb. 19



5. Charakterisierung des gereinigten pp 105

In den folgenden Abschnitten werden molekulare Eigenschaften des gereinigten pp 105 beschrieben. Eine entsprechende Charakterisierung molekularer Eigenschaften des pp 135 war wegen Materialmangels bislang nicht möglich. Dafür wurde die stark angereicherte pp 135 Phenylsepharosefraktion für eine vorläufige Charakterisierung herangezogen.

5.1. Identität der cytosolischen mit den Zelloberfläche-gebundenen Phosphoproteinen pp 105 und pp 135

Bei der intrazellulären Lokalisierung und Isolierung der beiden Phosphoproteine wurde zunächst davon ausgegangen, daß auf Grund der Phosphorylierbarkeit und des gleichen Molekulargewichts eine Identität zwischen cytosolischen und Zelloberfläche-gebundenen Komponenten bestand. Im Nachhinein ließ sich zeigen, daß diese Annahme richtig war.

Die Identität wurde ermittelt, indem einerseits intakte Zellen, andererseits gereinigtes pp 105 und angereichertes pp 135 mit der gereinigten cytosolischen Typ II Caseinkinase und γ^{32}P-ATP exogen, wie in Material und Methoden beschrieben, phosphoryliert wurden. Die phosphorylierten Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt und die pp 135 und pp 105 Banden nach autoradiographischer Lokalisation ausgeschnitten. Aliquote Teile der ausgeschnittenen Banden wurden mit jeweils unterschiedlichen Mengen an Staphylococcus aureus V8 Protease in einem zweiten SDS-Gel, wie in Material und Methoden beschrieben, partiell gespalten und die entstandenen Peptide aufgetrennt. Die autoradiographische Auswertung der Phosphopeptidmuster (Abb. 17) zeigte eine Übereinstimmung der cytosolischen mit den Zelloberfläche-gebundenen Komponenten. Keine Ähnlichkeiten ergaben sich jedoch zwischen pp 105 und pp 135 (siehe Abb. 17).

5.2. Molekulargewicht

Die Bestimmung des nativen Molekulargewichts von pp 105 erfolgte durch einen Vergleich der Sedimentationsgeschwindigkeit von pp 105 mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase als Molekulargewichtsstandard im Saccharosegradienten mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge (77).

100 µg ^{32}P-markiertes pp 105 und 10 µg Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in jeweils 100 µl H_2O wurden auf getrennte linear verlaufende Saccharosegradienten von 10-30 % in 4 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5/0.5 mM PMSF/2 mM PCMPS bzw. 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 aufgetragen. Nach 18-stündiger Zentrifugation bei 4°C und 157 000 g_{av} wurde durch Verdrängung mit 60 % Saccharose von unten nach oben in jeweils 24 Proben fraktioniert. Aliquote Teile der jeweiligen Proben wurden auf enzymatische Aktivität (Material und Methoden) bzw. Radioaktivität getestet (Abb. 18).

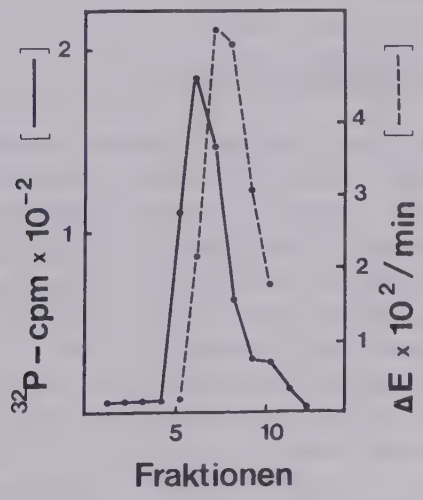


Abb. 18: Sedimentation von pp 105 und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Molekulargewichts-Standard) im Saccharosegradienten. —— pp 105 (^{32}P), ---- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (ΔE/min)

Die etwas schnellere Sedimentation der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit einem Molekulargewicht von 104 000 (78) im Vergleich zu pp 105 könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Form und Dichte der beiden Moleküle sein.

In Übereinstimmung mit der Sedimentationsmethode ergab eine Auftrennung von pp 105 im Polyacrylamidgel ohne SDS ebenfalls zwei Banden, wovon die Bande geringerer Mobilität weit weniger stark mit Coomassie anfärbbar war (Abb.19, siehe S.39).

Die beiden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnittenen und in einem zweiten SDS-Gel aufgetrennten Banden zeigten ein identisches Molekulargewicht von 105 000 D. Dies bedeutet, daß im nicht denaturierten Zustand pp 105 überwiegend als Monomer, ein kleinerer Teil jedoch als Dimer vorlag.

Im Rahmen der für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts von pp 105 verwendeten Sedimentationsmethode ergab sich, daß der überwiegende Anteil von pp 105 unter den angewandten Bedingungen im nativen Zustand als Monomer vorlag.

5.3. Phosphatgehalt von pp 105

Der Phosphatgehalt bekannter Phosphoproteine kann stark schwanken. So enthalten Histone je nach Typ 1 bis 7 Phosphatgruppen; α-Caseine 8 bis 9 und Phosvitin als am stärksten phosphoryliertes Protein 119 Phosphatgruppen (entsprechend 10 % P_i) pro Molekül (6). Die Anzahl der Phosphatgruppen beeinflußt insbesondere die Affinität des Moleküls zu divalenten Kationen und das chromatographische Verhalten. Nach Entfernung anorganischen Phosphats und Veraschung des Proteins wurde der Phosphatgehalt nach einer modifizierten Malachitgrünmethode (siehe Material und Methoden) bestimmt. Es ergab sich ein Gehalt von 7-9 Phosphatgruppen pro Molekül pp 105.

5.4. Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Fällbarkeit

Phosphoproteine zeichnen sich durch eine hohe Affinität zu di- und trivalenten Kationen aus. Diese Eigenschaft wird teilweise für spezifische Färbemethoden (79) und Isolierungsvorschriften (80, 81) genutzt. Von funktioneller Bedeutung ist diese Eigenschaft bei der Speicherung di- und trivalenter Kationen durch Casein und Phosvitin sowie der Calcifizierung von Dentin und Knochen (6). Durch die starke Bindung divalenter Kationen kann es zur Vernetzung der Proteine und damit zur Ausfällung kommen. Im folgenden wurde die Fällbarkeit von pp 105 über eine Vernetzung mit den divalenten Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} untersucht.

> Es wurden 50 µg ^{32}P-markiertes pp 105 in 100 µl 0.1 M Tris·Cl pH 7.5 mit unterschiedlichen Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Konzentrationen 30 min. bei 4°C inkubiert.
> Das Inkubationsgemisch wurde auf ein Kissen, bestehend aus 4 ml 10 % Saccharose in 0.1 M Tris·Cl pH 7.5 und den entsprechenden Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Konzentrationen bei 4°C aufgetragen. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 88 000 g_{av} wurde von je 50 µl des überschichteten Inkubationsgemisches die Radioaktivität bestimmt (Tab. 11).

In Tabelle 11 ist die Fällbarkeit von pp 105 mit Ca^{2+} und Mg^{2+} zusammengestellt.

Das pp 105 hat nach Tabelle 11 wesentlich höhere Löslichkeit als Mg^{2+}-Salz im Gegensatz zum Ca^{2+}-Salz. Bereits 5 mM Ca^{2+} bringen die gesamte eingesetzte Menge an pp 105 zur Ausfällung.

Tabelle 11: Nicht fällbarer Anteil von ^{32}P-markiertem pp 105 in Abhängigkeit von der Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Konzentration

Konzentration (mM)	nicht fällbares pp 105 in (%)
Mg^{2+}	
0	100
10	114
20	63
Ca^{2+}	
0	100
0.5	94
1	75
3	6
5	0
10	0
20	0

5.5. Charakterisierung der pp 105 Kinaseaktivität

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei endogener Phosphorylierung intakter Mäusefibroblasten in Suspension der ^{32}P-Einbau in das auf der Zelloberfläche gebundene pp 105 linear von der Zelldichte abhängt. Damit ließen sich Zell-Zellwechselwirkungen auf die endogene Phosphorylierung ausschließen. Der ^{32}P-Einbau in pp 105 konnte somit entweder durch Kinasen auf derselben Zelloberfläche erfolgen oder durch eine Autophosphorylierung, wie sie vielfach beschrieben ist (10). Zur Überprüfung einer Autophosphorylierungsreaktion wurde pp 105 in Abwesenheit von PCMPS und vormarkiertem pp 105 gereinigt. Nach Autophosphorylierung

mit zugesetztem γ^{32}P-ATP wurden die jeweiligen Inkubationsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt und der ^{32}P-Einbau in pp 105, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt.

5.5.1. Kinaseaktivität ist keine Begleitverunreinigung von pp 105

Nachdem die Inkubation des gereinigten pp 105 mit γ^{32}P-ATP einen ^{32}P-Einbau in pp 105 ergab, mußte sichergestellt werden, daß die Kinaseaktivität nicht von Begleitverunreinigungen herrührte.

> Es wurde daher gereinigtes pp 105 einerseits in einem Polyacrylamidgel ohne SDS, andererseits nach 2-minütiger Inkubation bei 100°C mit SDS/β-Me haltigem Puffer in einem Polyacrylamidgel mit SDS aufgetrennt. Nach kurzer Anfärbung der Gele mit einer wäßrigen 1 %igen Coomassie Brilliant Blue R250 Lösung und folgender Entfärbung mit H_2O wurden die pp 105 Banden des jeweiligen Gels herausgeschnitten und gelelektrophoretisch nach der Methode von Mendel-Hartvig (67) ohne SDS eluiert.
> Aliquote Teile der so erhaltenen pp 105 Proben wurden 2 h bei 37°C autophosphoryliert (ca. 20 µg pp 105 in 50 µl 50 mM Na-phosphat pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 20 µl γ^{32}P-ATP) und danach 5 min. bei 100°C mit SDS/β-Me-haltigem Probenpuffer inkubiert. Um unspezifische Adsorptionen des γ^{32}P-ATP an pp 105 auszuschließen, wurden entsprechende Autophosphorylierungsansätze als Kontrolle ohne weitere Inkubation sofort mit SDS/β-Me haltigem Probenpuffer 5 min. bei 100°C gekocht.

Eine Autophosphorylierung ergab sich nur nach 2-stündiger Inkubation. Auch die denaturierte Probe zeigte Phosphotransferaseaktivität, so daß unter den angegebenen Bedingungen eine Renaturierung erfolgt sein mußte. Da sich die Trennprinzipien des Gels ohne SDS (Ladung und Molekulargewicht)

unterscheiden und nach beiden Methoden aufgetrenntes pp 105 autophosphoryliert wurde, ist eine Verunreinigung durch Fremdkinasen auszuschließen.

5.5.2. Zeitabhängigkeit der pp 105 Autophosphorylierung

Die Autophosphorylierung von pp 105 (20 µg in 50 µl 50 mM Na-phosphat/Glycin pH 8.2, 10 mM $MgCl_2$, 15 mM β-Me, 20 µCi γ^{32}P-ATP) verlief in dem untersuchten Zeitraum von 12 h linear mit einer sehr geringen spezifischen Aktivität von 2.9 pmol P_i/hxmg pp 105 (Abb. 20).

Da ein hemmender Einfluß von Phosphationen auf einige Proteinkinasen beschrieben ist (74), wurde der Phosphat/Glycin Puffer durch 50 mM Tris-Cl pH 8.2 ersetzt. Die spezifische Aktivität sank jedoch um 50 %.

5.5.3. pH-Abhängigkeit der pp 105-Autophosphorylierung

Das pH-Optimum der meisten Proteinkinasen liegt in einem Bereich zwischen pH 6-8 (6).

> Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Autophosphorylierung wurden jeweils 20 µg gereinigtes pp 105 in 50 µl 50 mM Na-Phosphat/Glycin Puffer pH 7.3, 8.2, 8.8 und 9.6 mit 10 mM $MgCl_2$, 15 mM β-Me und 20 µCi γ^{32}P-ATP 90 min. bei 37°C inkubiert.

Das pH-Optimum der Kinaseaktivität lag zwischen pH 8.2 und 8.8 (Abb. 20).

5.5.4. Abhängigkeit der pp 105 Kinase von der Salzkonzentration

Jeweils 20 µg gereinigtes pp 105 wurden in 50 µl 50 mM Na-Phosphat pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 15 mM β-Me, 20 µCi γ^{32}P-ATP und unterschiedlichen Mengen an NaCl (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 und 0.7 M) 90 min. bei 37°C inkubiert.

Die maximale Kinaseaktivität ergab sich für eine physiologische Salzkonzentration (Abb. 20).

5.5.5. Abhängigkeit der pp 105 Kinase von zweiwertigen Kationen

Phosphorylierungsreaktionen mit ATP oder GTP sind im allgemeinen von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen abhängig. Die meisten Proteinkinasen benötigen Mg^{2+}, welches teilweise meist jedoch weniger effektiv durch Mn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} und Ca^{2+} ersetzt werden kann (6). Einige wenige Proteinkinasen wie z.B. Phosphorylase Kinase und die, die leichte Kette des Myosins phosphorylierende Kinase (7) sind Ca^{2+}-abhängig. In einem untersuchten Mg^{2+}-Konzentrationsbereich von 0-20 mM ließ sich mit 90-minütiger Inkubation bei 37°C (20 µg pp 105 in 50 µl 50 mM Na-phosphat pH 7.8, 0-20 mM $MgCl_2$, 15 mM β-Me, 20 µCi γ^{32}P-ATP) die autokatalytische Aktivität linear erhöhen (Abb. 20). Auch ohne Mg^{2+} war eine geringe Basisaktivität nachweisbar (Abb. 20). Eine Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung bei Zusatz des Chelators für zweiwertige Kationen EDTA (5 mM) unter sonst gleichen Phosphorylierungsbedingungen wie oben jedoch ohne Mg^{2+} erbrachte eine spezifische Aktivität von 0.2 pmol P_i/hxmg pp 105 entsprechend ca. 6 % der spezifischen Aktivität bei Anwesenheit von 10 mM Mg^{2+}.

Ca^{2+} vermag in einer Konzentration von 0.5 mM Mg^{2+} zu ersetzen. Mit einer 90-minütigen Inkubation bei 37°C von 20 µg

pp 105 in 50 µl 50 mM Tris·Cl pH 7.5, 15 mM β-Me und 20 µCi γ^{32}P-ATP ergaben sich für

0.5 mM Ca^{2+}: 366 cpm
0.5 mM Mg^{2+}: 319 cpm
5 mM EDTA: 174 cpm

Höhere Ca^{2+}-Konzentrationen führten bereits zu einer Ausfällung von pp 105 (Kap. 5.4.).

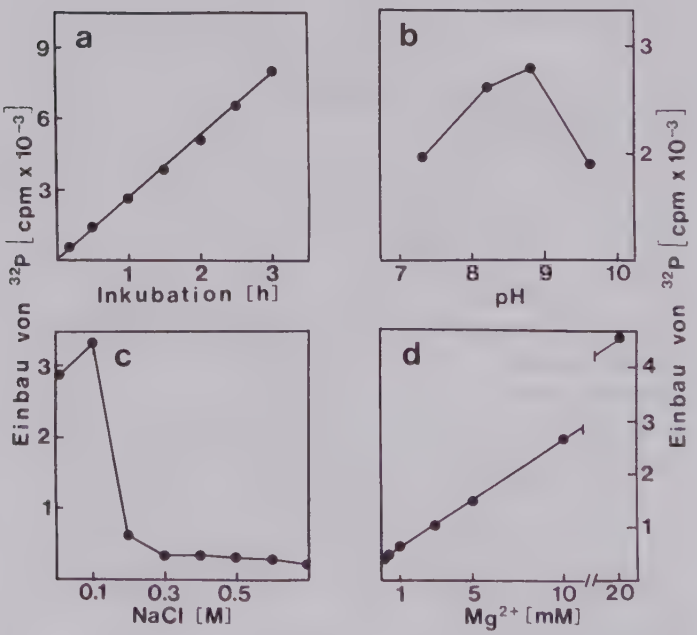


Abb. 20: Autophosphorylierung von pp 105 mit γ^{32}P-ATP. a) Zeitverlauf, b) pH-Abhängigkeit, c) Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration, d) Abhängigkeit von der Mg^{2+}-Konzentration.

5.5.6. Substratspezifität der pp 105 Kinaseaktivität

Abgesehen von wenigen Ausnahmen, wie der Phosphorylasekinase, der Opsinkinase und der Myosin-Leichtketten-Kinase, zeigen die bekannten Proteinkinasen keine ausgeprägte Substratspezifität, so daß auch andere Proteine als Substrat phosphoryliert werden. Als geeignete Substrate, die je nach Kinasetyp unterschiedlich stark phosphoryliert werden, haben sich Histon, Protamin, Casein und Phosvitin erwiesen (6).

Es wurden jeweils 20 µg pp 105 90 min. bei 37°C mit 50 µg Histon, Casein oder Phosvitin in 50 µl 50 mM Na-phosphat pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 15 mM β-Me und 20 µCi γ^{32}P-ATP inkubiert.

Bezogen auf 1 mg/ml Phosphatakzeptor ist pp 105 bestes Substrat vor Phosvitin (Tab. 12). Die pp 105 assoziierte Kinase könnte daher als Phosvitinkinase mit hoher Eigenspezifität bezeichnet werden.

Tabelle 12: Phosphorylierung unterschiedlicher Substrate mit pp 105

zugesetztes Fremdsubstrat	^{32}P-Einbau bezogen auf 1 mg Phosphatakzeptor (^{32}P-cpm x 10^{-3})	
	Substrat	pp 105
Histon	40	192
Casein	23	168
Phosvitin	88	128
-	-	145

5.5.7. Phosphoaminosäuren des autophosphorylierten pp 105

Die meisten zellulären Proteinkinasen übertragen die Phosphatgruppe auf Serin- u/o weniger häufig auf Threoninreste im Zielprotein. Einige wenige zelluläre Proteinkinasen, unter anderem die EGF abhängige Proteinkinase, sowie die meisten viralen Proteinkinasen übertragen die Phosphatgruppe jedoch auf Tyrosinreste (10). In einer vorherigen Arbeit (35) konnte bereits gezeigt werden, daß bei endogener Phosphorylierung intakter STU 51A-232B Suspensionszellen der Hauptteil des ^{32}P an Serin und nur ein kleiner Anteil an Threonin in das an der Zelloberfläche gelegene pp 105 eingebaut wurde.

> Für eine Analyse der Phosphoaminosäuren wurde autophorphoryliertes und TCA gefälltes pp 105 4 h bei 105°C in 6 N HCl unter N_2 hydrolysiert. Das unter N_2 eingedampfte Hydrolysat wurde elektrophoretisch aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen.

Von den untersuchten Phosphoaminosäuren P-Ser, P-Thr und P-Tyr war nur der Serinrest phosphoryliert (Abb. 21).

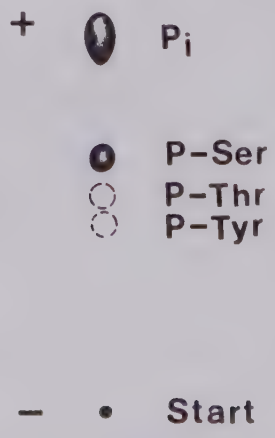


Abb. 21: Autoradiogramm einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung eines 4-stündigen Hydrolysats von autophosphoryliertem pp 105. + Anode, - Kathode.

5.5.8. Einfluß von Effektoren auf die Autophosphorylierung von pp 105

Die katalytische Aktivität vieler Proteinkinasen wird durch niedermolekulare Effektoren, wie cAMP und Ca^{2+}, reguliert. Bei cAMP abhängigen Proteinkinasen setzt cAMP durch Bindung an eine regulatorische Untereinheit eine enzymatisch aktive katalytische Untereinheit frei. Durch Zusatz einer regulatorischen Untereinheit oder des in vielen Geweben vorkommenden Proteinkinaseinhibitors (82) läßt sich umgekehrt die katalytische Aktivität hemmen.

Bei Ca^{2+}-abhängigen Proteinkinasen wird die katalytische Aktivität über das Ca^{2+}-bindende Calmodulin aktiviert.

Im folgenden wurde der Einfluß von regulatorischer Untereinheit, Proteinkinaseinhibitor und Calmodulin auf die Autophosphorylierungsreaktion untersucht.

Die regulatorische Untereinheit wurde mit 70 U/20 µg pp 105 zur Autophosphorylierung (siehe Kap. 5.4.3., pH 8.2) eingesetzt.
Der Proteinkinaseinhibitor wurde mit 5 µg/20 µg pp 105 zur Autophosphorylierung unter Standardphosphorylierungsbedingungen eingesetzt. Der Einfluß von Calmodulin auf die Autophosphorylierungsreaktion wurde in 50 mM Tris·Cl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 mM DTT und Ca^{2+}-Konzentrationen von 0-100 µM untersucht. Die Ca^{2+}-Konzentrationen wurden mit einer Ca^{2+}/EGTA Lösung eingestellt (83).
Calmodulin wurde mit 5 µg/20 µg pp 105 eingesetzt.
Die Phosphorylierung erfolgte jeweils in 50 µl Volumen mit 20 µCi γ^{32}P-ATP 2 h bei 37°C.

Keiner der untersuchten Effektoren hatte einen Einfluß auf die Autophosphorylierungsreaktion.

6. Vorkommen der Phosphoproteine pp 105 und pp 135

Die Verteilung eines Proteins auf verschiedene Gewebetypen sowie seine intrazelluläre Lokalisation geben oftmals Hinweise auf eine mögliche biologische Funktion. Von ähnlichem Interesse ist es zu wissen, ob ein Protein im Verlauf der Evolution sich konservativ verhielt und auch bei anderen Spezies mit ähnlichen molekularen Kriterien nachzuweisen ist.

Mit Hilfe der Molekulargewichtsbestimmung, der endogenen Phosphorylierung sowie immunologischer Methoden wurden diese Fragen in den folgenden Abschnitten bearbeitet.

6.1. Verteilung der Phosphoproteine pp 105 und pp 135 auf das Normalgewebe der STU-Maus

Sechzehn verschiedene Gewebeproben wurden aus 8-9 Wochen alten STU-Mäusen (mit Ausnahme von Thymus) entnommen und homogenisiert.

Nach fraktionierter Zentrifugation wurden vom hochtourigen Überstand jeweils 150 µg Protein unter Standardbedingungen 1 min endogen phosphoryliert. Die phosphorylierten Proben wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und der ^{32}P Einbau in pp 105 und pp 135 autoradiographisch verglichen.

Der ^{32}P-Einbau in pp 105 und pp 135 ist in Tabelle 13 zusammengestellt.

Für einen vergleichenden immunologischen Nachweis von pp 105 und pp 135 wurde der Gewebeaufschluß unter Bedingungen vorgenommen, die einen proteolytischen Abbau weitgehendst unmöglich machen.

Die frisch entnommenen Gewebe wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und nach Zermösern 5 min. bei 100°C in 0.1 % SDS/1 mM EDTA/0.5 mM PMSF inkubiert.

Vor der SDS-gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proben nochmals 5 min. bei 100°C mit SDS/β-ME haltigem Probenpuffer inkubiert. Die aufgetrennten Proben wurden elektrophoretisch auf Nitrocellulose transferiert und wie in Material und Methoden beschrieben immunologisch mit einem spezifischen Antiserum (siehe Kap. 6.3.) gegen pp 105 bzw. pp 135 auf die Anwesenheit von pp 105 bzw. pp 135 hin untersucht.

Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 13 zusammengestellt. Unter den Bedingungen der Immuntransfertechnik mit den verwendeten Antiseren lag die Nachweisgrenze für pp 105 bei ca. 15 ng, für pp 135 bei ca. 70 ng.

Tabelle 13: Vergleich der Mengen von pp 105 und pp 135 in Gewebehomogenaten der Maus.
endogene Phosphorylierung: (^{32}P-cpm)
+++ >9000 cpm, ++ 3000-6000 cpm, + 1000-3000 cpm, (+) <100 cpm.
Immuntransfer: relative Abschätzung

Gewebe	Endogene Phosphorylierung		Immuntransfer	
	pp105	pp135	pp105	pp135
Thymus (6 Wochen)	+++	+++	+++	+
Thymus (6 Monate)	+	+	+	-
Foetus (17 Tage)	++	+	+	-
Knochenmark	++	++	n.b.	-
Lymphknoten	++	+	+	-
Milz	++	(+)	++	-
Gehirn	+	++	+	-
Epididymaler Fettkörper	(+)	(+)	+	-
Plazenta	(+)	+	+	-
Lunge	-	+	-	-
Herz	-	(+)	-	-
Skelettmuskel	-	(+)	-	-
Leber	-	(+)	-	-
Niere	-	(+)	-	-
Dünndarm	-	-	-	-
Haut	-	-	-	-

n.b. nicht bestimmt

Ein Vergleich der Ergebnisse von endogener Phosphorylierung und Immuntransfer (siehe Tab. 13) ergaben gute Übereinstimmungen für pp 105. PP 135 dagegen konnte immunologisch nur im endogen sehr gut phosphorylierbaren Thymushomogenat einer 6 Wochen alten Maus nachgewiesen werden. Eine höhere Nachweisempfindlichkeit mittels der endogenen Phosphorylierung im Falle des pp 135 könnte dafür verantwortlich sein. Ein Vortäuschen der Anwesenheit von pp 135 durch andere Phosphoproteine nach endogener Phosphorylierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Beide Phosphoproteine pp 105 und pp 135 scheinen vermehrt in Geweben proliferativ wachsender Zellen mesenchymalen Ursprungs vorzukommen. Eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Gewebetyp ist jedoch nicht möglich.

6.2. Endogene Phosphorylierung intakter Zellen verschiedener Zellinien - immunologischer Nachweis von pp 105 und pp 135

In einer früheren Arbeit (35) wurde pp 105 und pp 135 auf der Zelloberfläche von in Suspensionskultur gehaltenen SV-40 transformierten Mäusefibroblasten lokalisiert. Im folgenden wurde vergleichend nach ähnlichen Komponenten auf der Zelloberfläche in Suspensionskultur gehaltener Zellen anderer Zellinien gesucht. Ein immunologischer Vergleich von pp 105 und pp 135 der einzelnen Zellinien erfolgte mit Hilfe der Proteintransfertechnik (84, 85).

SV-40 transformierte Mäusefibroblasten (STU 51A-232B), RSV transformierte Mäusefibroblasten (STU-D1756), SV-40 transformierte Hamsterfibroblasten (K42-A2) und menschliche epitheliale HeLa Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, endogen mit γ^{32}P-ATP und γ^{32}P-GTP phosphoryliert. Die phosphorylierten Komponenten wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Autoradiogramm verglichen

(Abb. 22). Alle vier Zellinien hatten eine mit ATP und GTP phosphorylierbare Oberflächenkomponente pp 105. Eine ebenfalls mit ATP und GTP phosphorylierbare Oberflächenkomponente pp 135 hatten nur die fibroblastischen Zellinien, HeLa zeigte jedoch eine entsprechende Komponente mit 128 KD (pp 128).

Ein immunologischer Vergleich von pp 105 und pp 135 bzw. pp 128 wurde an SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennten Zellextrakten oben erwähnter Zellen und fibroblastischer Embryonalzellen der STU-Maus vorgenommen (Abb. 23). Immunologisch konnte für alle untersuchten Zellen ein kreuzreagierendes pp 105 nachgewiesen werden. Ein kreuzreagierendes pp 135 wurde nur für die fibroblastischen Zellen gefunden. Eine immunologische Ähnlichkeit zwischen Maus-pp 135 und humanem pp 128 war in der Immuntransfertechnik nicht nachzuweisen. Bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Lokalisation konnte jedoch ein mit pp 135 kreuzreagierendes Protein nachgewiesen werden (siehe Kap. 6.4.4.).

Abb. 22: Autoradiographie der Phosphoproteine, die nach 3-minütiger Phosphorylierung intakter Zellen (10^7 Zellen/ml) mit ATP und GTP erhalten wurden. Das SDS-Polyacrylamidgel (7.5 %) wurde mit je 8 x 10^4 Zellen beladen.
Zell-Linien: a,e: SV40 transformierte STU 51A-232B Mauszellen; b,f: RSV transformierte STU-D1756 Mauszellen; c,g: SV40 transformierte K41-A2 Hamsterzellen; d,h: HeLa-Zellen.
Phosphorylierung mit ATP: a, b, c, d; mit GTP: e, f, g, h.

Abb. 23: Immuntransfer SDS-gelelektrophoretisch (7.5 %) aufgetrennter Zellproben (80 µg Protein) mit Antiserum gegen pp 105 bzw. pp 135.
a) SV40 transformierte K41-A2 Hamsterzellen, b) Mäuseembryonalzellen, c) SV40 transformierte STU 51A-232B Mauszellen, d) RSV transformierte STU-D1756 Mauszellen, e) HeLa-Zellen.

Abb. 22

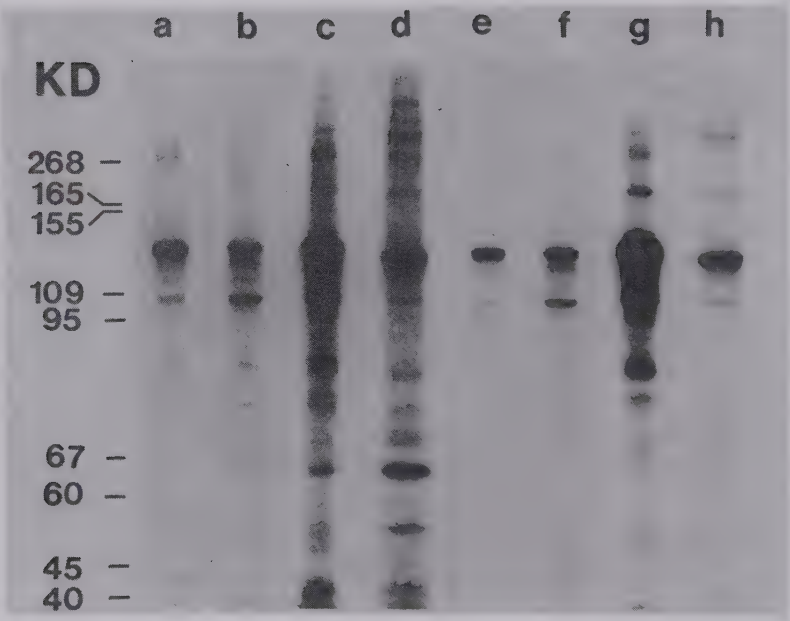
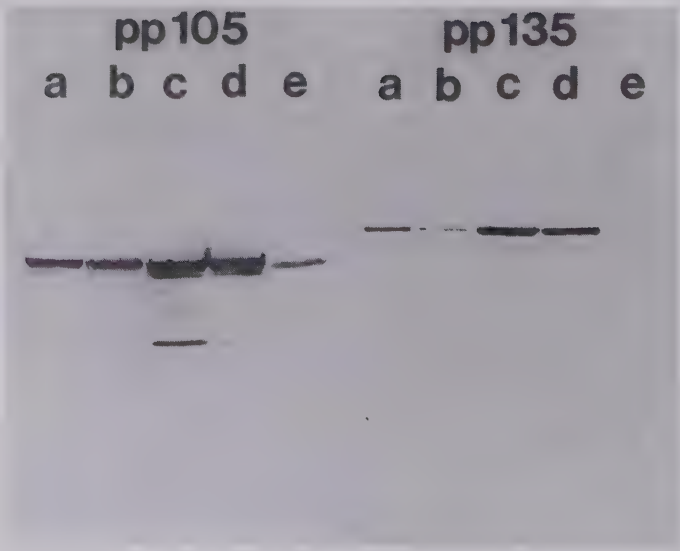

a
b
c
d
e
f
g
h
KD
268
165
155
109
95
67
60
45
40

Abb. 23


pp105
pp135
a b c d e a b c d e

6.3. Produktion monospezifischer Antiseren gegen pp 105 und pp 135

Monospezifische Antiseren sind äußerst wertvolle Reagenzien beim Studium biologischer Funktionen von Proteinen. Neben einer Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle mit immunchemischen Methoden (z.B. Immunfluoreszenzmikroskopie) ist eine Quantifizierung des Antigens (z.B. RIA, ELISA) möglich. Ebenso läßt sich das Antigen über eine Immunpräzipitation schnell und einfach isolieren, so daß sich biologisch bedeutsame Veränderungen am Antigen z.B. im Verlauf des Zellzyklus gut untersuchen lassen.

In dieser Arbeit wurde natives gereinigtes pp 105 zur Produktion von Antiserum im Kaninchen herangezogen. Gegen SDS-gelelektrophoretisch gereinigtes, d.h. weitgehend denaturiertes pp 135 wurde Antiserum in Ratten gewonnen. Eine Charakterisierung der Antiseren wurde mit Hilfe der Immuntransfertechnik, der Immundiffusion nach Ouchterlony und der Immunpräzipitation vorgenommen. Eine Gewinnung der IgG-Fraktion aus Antiseren erfolgte über eine Ammonsulfatfällung mit einer anschließenden Chromatographie an DEAE-Cellulose. Für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden teilweise die spezifischen Antikörper über eine Affinitätschromatographie mit dem zugehörigen Antigen gereinigt.

Im Immuntransfer von Zellhomogenaten ergaben sich für Antiseren gegen pp 105 zusätzlich schwache Kreuzreaktivitäten mit anderen Komponenten, insbesondere einer Komponente mit einem Molekulargewicht von 80 000, vermutlich einem Abbauprodukt von pp 105. Die Antiseren gegen pp 135 reagierten im Immuntransfer von Zellhomogenaten (siehe Abb. 23) fast ausschließlich mit pp 135. Eine Immunpräzipitation aus phosphorylierten und mit Detergenzien solubilisierten Zellhomogenaten mit Antiseren gegen pp 105 bzw. pp 135 resultierte ausschließlich in gefälltem ^{32}P-pp 105 bzw. ^{32}P-pp 135 (Abb. 24, siehe S.61). Eine Kreuzreaktivität der Antiseren gegen pp 105 bzw. pp 135 war nicht gegeben.

6.4. Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von pp 105 und pp 135

Zur Lokalisation von Proteinen in der Zelle können prinzipiell zwei Methoden herangezogen werden, zum einen die Zellfraktionierung, zum anderen die in situ Lokalisierung durch Verwendung spezifischer Reagentien. Beide Methoden haben ihre Nachteile. Bei der Zellfraktionierung können Kreuzkontaminationen und selektiver Verlust von Komponenten vorkommen, bei in situ Lokalisationstechniken hingegen können die Spezifität des Reagenz, die Erhaltung und Zugänglichkeit des Proteins bei der Fixierung kritisch sein. Auf die Bedeutung divalenter Kationen für die subzelluläre Verteilung der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 wurde bereits in Kap. 2.4. eingegangen. Die Probleme bei der in situ Lokalisation von Proteinen mit immunologischen Techniken sollen in den folgenden Kapiteln besprochen werden.

Für die in situ Lokalisation der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 wurde die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie gewählt. Hierbei wurden Zellen oder Gewebe nach entsprechender Vorbehandlung zunächst mit einem monospezifischen Antikörper gegen das zu untersuchende Antigen inkubiert. Nach Auswaschen nicht gebundenen Antikörpers wurde mit einem zweiten, mit fluoreszierendem Farbstoff markierten, gegen den ersten Antikörper gerichteten Antikörper inkubiert. Nach Auswaschen des nicht gebundenen zweiten Antikörpers ließ sich der am ersten Antikörper und somit indirekt am Antigen gebundene zweite Antikörper im Fluoreszenzmikroskop nachweisen. Eine gleiche Behandlung mit dem entsprechenden Präimmunserum (erster Antikörper) wurde als Kontrolle unspezifischer Anfärbung stets vorgenommen.

6.4.1. Spezifität des verwendeten Antikörpers

Es ist bekannt, daß viele Seren Autoantikörper gegen zelluläre Komponenten enthalten (87). Bei Verwendung von Antikörpern, die nicht affinitätschromatographisch gereinigt wurden, muß die Spezifität dieser Antikörper sichergestellt werden.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen pp 105 und pp 135 wurde die Spezifität mit der Immuntransfertechnik und der Immunpräzipitation untersucht. Hierzu wurden Zellhomogenate SV40 transformierter Mäusefibroblasten, dem Ausgangsmaterial der pp 105 und pp 135 Isolierung, verwendet. In beiden Techniken ergab sich eine hohe Spezifität der Antikörper gegen pp 105 und pp 135. Unspezifische Bindungen der fluoreszenzmarkierten Anti IgG-Antikörper wurden in Kontrollexperimenten festgestellt und konnten durch eine Immunabsorption an TCA gefällten Zellhomogenaten eliminiert werden.

6.4.2. Immunlokalisation von pp 105 und pp 135 auf der Oberfläche adhärenter und Suspensionszellen (STU 51A-232B)

In einer früheren Arbeit (49) wurden die beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 über eine endogene Phosphorylierung intakter Zellen an der Oberfläche von Suspensionszellen, nicht jedoch von adhärent wachsenden Zellen gefunden. Es wurde daher in dieser Arbeit versucht, dieses Ergebnis mit Hilfe immunologischer Methoden zu bestätigen. Die Lokalisation eines Antigens auf der Zelloberfläche kann entweder an der intakten Zelle bei $0^{o}C$ oder an der mit Glutardialdehyd oder Formaldehyd fixierten und nicht permeabilisierten Zelle vorgenommen werden (86). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fixierung mit Formaldehyd und anschließender Immunfärbung gewählt.

Eine Lokalisation von pp 135 an der Oberfläche von adhärenten und Suspensionszellen war nicht möglich. Ebensowenig gelang eine Lokalisation von pp 105 an der Oberfläche von adhärent wachsenden Zellen. An der Oberfläche von Suspensionszellen konnten jedoch geringe Mengen von pp 105 nachgewiesen werden (Abb. 25). Die Intensität der Färbung war aber von Probe zu Probe unterschiedlich.

Abb. 24: Immunpräzipitation von pp 105 und pp 135 aus endogen phosphoryliertem Zellhomogenat (STU 51A-232B). Autoradiographie von a) Zellhomogenat vor Immunpräzipitation, b) immunpräzipitiertes pp 105, c) immunpräzipitiertes pp 135.

Abb. 25: Immunfluoreszenzlokalisation von pp105 an der Oberfläche von STU 51A-232B Suspensionszellen. Anti pp 105-Verdünnung 1:80. Verdünnung des FITC markierten Anti-Kaninchen IgG 1:80. Vergrößerung ca. x 1500.

Abb. 26: Immunfluoreszenzlokalisation von pp 105 in Mäuseembryonalzellen. Einstufige Acetonfixierung. Anti pp 105 1:50 Verdünnung. FITC markiertes Anti-Kaninchen IgG 1:80 Verdünnung. Vergrößerung ca. x 950.

Abb. 27: Immunlokalisation von pp 105 in Mäuseembryonalzellen. Einstufige Ethanolfixierung. Anti pp 105 1:50 Verdünnung. FITC markiertes Anti-Kaninchen IgG 1:80 Verdünnung. Vergrößerung ca. x 950.

Abb. 24

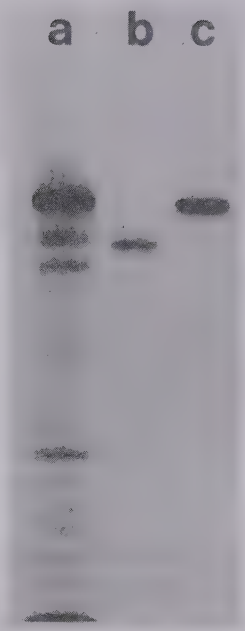


Abb. 25

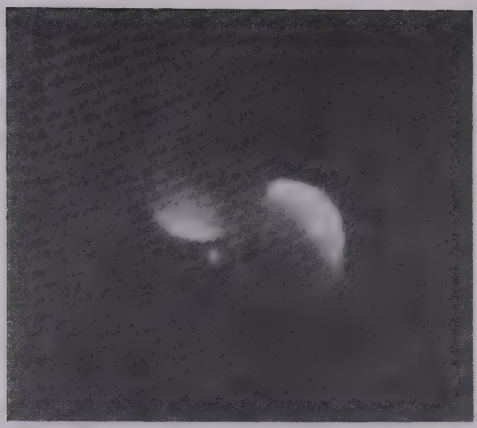


Abb. 26

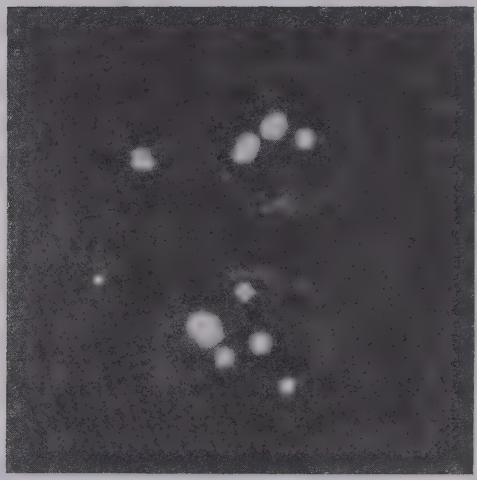
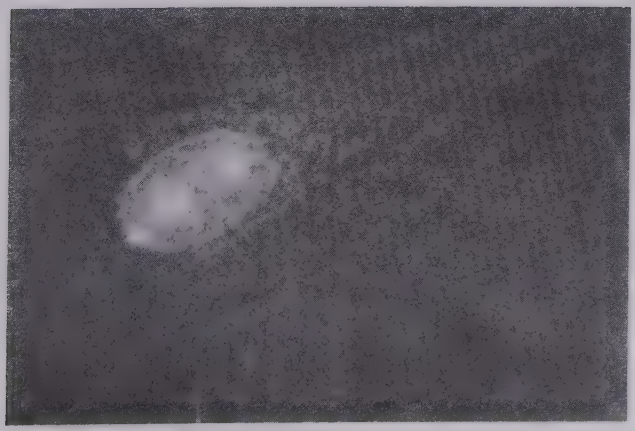


Abb. 27



6.4.3. Intrazelluläre Immunlokalisation von pp 105 und pp 135

Zur immunfluoreszenzmikroskopischen Darstellung intrazellulärer Antigene muß die Zelle fixiert und zusätzlich permeabilisiert werden, damit die Antikörper das Antigen erreichen können. Neben einstufigen Verfahren der Fixierung/Permeabilisierung mit Aceton, Alkohol oder Dimethylsulfoxyd gibt es zweistufige Verfahren der Fixierung mit Glutardialdehyd oder Formaldehyd und anschließender Permeabilisierung mit Aceton, Alkohol oder Triton X-100 (87). Die Wahl der Behandlung kann einen großen Einfluß auf die Immunlokalisation ausüben (88).

Genauere Untersuchungen hierzu wurden für die Immunlokalisation von pp 105 in adhärent wachsenden Embryonalzellen vorgenommen, die nach Kap. 6.1. und 6.2. große Mengen an pp 105 enthielten.

a) einstufige Fixierung

Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden 10 min. bei R.T. oder -20°C fixiert und nach 2 x 5-minütiger Inkubation in PBS immunologisch angefärbt. Das immunfluoreszenzmikroskopische Bild ergab meist eine Lokalisation von pp 105 um den Kern mit einigen Flecken im Kern (Abb. 26). Eine Assoziation mit cytoskelettalen Strukturen war häufig deutlich ausgeprägt (Abb. 27).

b) zweistufige Fixierung

Für eine zweistufige Fixierung mit Glutardialdehyd wurden die mit PBS gewaschenen Zellen 15 min. bei R.T. in 1 % Glutardialdehyd in PBS fixiert und 15 min. mit Methanol (-20°C) permeabilisiert. Danach wurde 3 x 4 min. mit Natriumborhydrid (0.5 mg/ml PBS) behandelt und weitere

2 x 3 min. mit PBS gewaschen und dann immunologisch angefärbt.
Für eine zweistufige, im folgenden routinemäßig durchgeführte Fixierung mit Formaldehyd wurden die mit PBS gewaschenen Zellen 10 min. bei R.T. mit Methanol permeabilisiert. Nach 2 x 5 min. Inkubation in PBS wurde immunologisch angefärbt.

Nach den zweistufigen Fixierungsmethoden zeigten alle interphasischen Zellen eine ausschließlich auf den Kern begrenzte Immunfluoreszenz (Abb. 28a u. 29a).

Bei Behandlung der Zellen mit Ethanol, Methanol oder Aceton allein diffundierte offensichtlich der Hauptteil von pp 105 aus dem Kern und haftete sekundär an cytoskelettalen Strukturen. Die Diffusion mußte relativ schnell verlaufen, da bereits nach 10-minütiger Methanolbehandlung mit anschließender Formaldehydfixierung das meiste pp 105 aus dem Kern verschwunden war. Die Diffusion ließ sich durch Zusatz divalenter Kationen (1 mM $CaCl_2$/1 mM $MgCl_2$) bei der einstufigen Fixierung mit Methanol stark herabsetzen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der subzellulären Fraktionierung in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an divalenten Kationen. Offensichtlich wird die Lokalisation von pp 105 und vermutlich auch die von pp 135 im Zellkern durch Anwesenheit divalenter Kationen stabilisiert.

Für die folgenden Immunlokalisationen von pp 105 und pp 135 wurde die zweistufige Formaldehydfixierung gewählt. Untersucht wurden adhärente und in Suspension gehaltene STU 51A-232B Zellen, Mäuseembryonalzellen und menschliche HeLa Zellen. Beide Phosphoproteine erschienen im Kern der Zellen. Mäuse- und Mensch - pp 105 war diffus im gesamten Kern mit einem verstärkten Auftreten in ringförmig bis fleckenartigen Kernstrukturen nachzuweisen (Abb. 28 a)

Mäuse - pp 135 erschien fast ausschließlich in punktförmigen Anhäufungen im Kern (Abb.28b). Eine entsprechende schwach angefärbte mit pp 135 kreuzreagierende menschliche Komponente war im Kern von HeLa Zellen nachzuweisen.

Abb. 28a

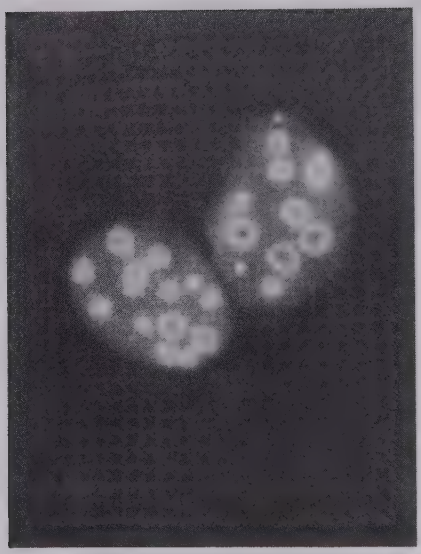


Abb. 29a

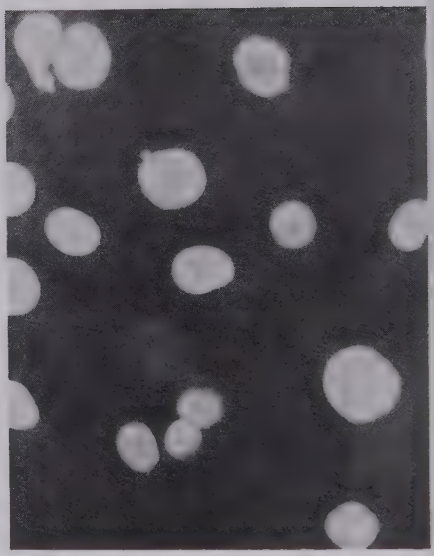
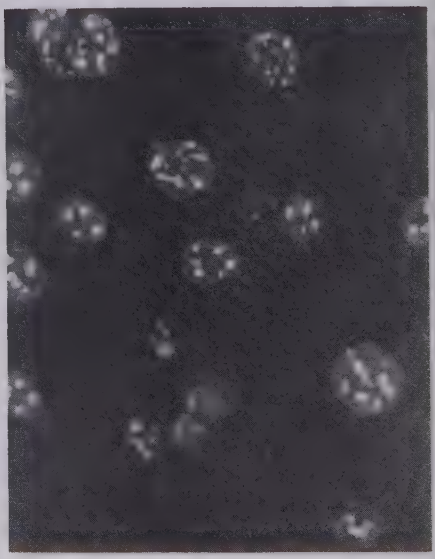


Abb. 28b



Da beide Phosphoproteine in morphologisch ähnlichen Kernbereichen konzentriert waren, wurde mit einer Doppelfärbung die räumliche Beziehung der beiden Phosphoproteine zueinander untersucht. Hierzu wurde pp 105 mit rot fluoreszierendem Rhodamin (TRITC)-markiertem Antikörper, pp 135 mit grün fluoreszierendem Fluorescein (FITC)-markiertem Antikörper am gleichen Präparat sichtbar gemacht. Es zeigte sich, daß pp 135 innerhalb der ringförmig/fleckenartigen Anfärbungen für pp 105 gelegen war (Abb. 29a und 29b).

Eine nähere Untersuchung der durch beide Antikörperspezifitäten stark anfärbbaren Kernstrukturen führte zu ihrer Identifizierung als Nucleoli, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird.

Abb. 28a: Immunlokalisation von pp 105 in Mäuseembryonalzellen. Fixierung in 4 % Formaldehyd (10 min.). Permeabilisierung in Methanol (10 min.). Anti pp 105 1:80 verdünnt. FITC anti Kaninchen IgG 1:80 verdünnt. Vergrößerung x 1500.

Abb. 28b: Immunlokalisation von pp 135 in Mäuseembryonalzellen. Fixierung und Permeabilisierung wie in Abb. 28a.Anti pp 135 1:30 verdünnt. FITC anti Ratten IgG 1:50 verdünnt. Vergrößerung ca. x 1500.

Abb. 29a und 29b:
Doppelfärbung mit anti pp 105 1:80 verdünnt. TRITC anti Kaninchen IgG 1:80 verdünnt. Anti pp135 1:30 verdünnt. FITC anti Ratten IgG 1:50 verdünnt. a) Selektivaufnahme von pp 105 b) Selektivaufnahme von pp 135. Vergrößerung ca. x 950

7. Potentielle biologische Funktionen der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135

Die Klärung der biologischen Funktion von Proteinen, für die eine spezifische enzymatische Funktion nicht nachzuweisen ist, kann äußerst schwierig sein. Erste Anhaltspunkte für eine Funktion können die Verteilung der Proteine auf bestimmte Zellen und Gewebe sowie die Kompartimentierung der Proteine innerhalb der Zelle liefern. Bei Proteinen, die sich in vitro phosphorylieren lassen, ist es insbesondere wichtig zu wissen, ob dies auch in vivo geschieht. In vivo Phosphorylierungen von Proteinen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse (5); eine Korrelation der Phosphorylierung mit bestimmten physiologischen Zuständen der Zelle kann daher einen weiteren Einblick in die Funktion der beteiligten Proteine geben. In den folgenden Kapiteln werden erste Ansätze zur vorläufigen Charakterisierung der biologischen Funktion der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 beschrieben.

7.1. In vivo Phosphorylierung der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135

Endogene in vitro Phosphorylierungen von intakten Zellen oder Zellfraktionen mit zugesetztem γ^{32}P-ATP sind wichtig zur Identifizierung phosphorylierbarer Komponenten. Ob jedoch eine Phosphorylierung dieser Komponenten bei intakter Kompartimentierung der Zelle und physiologischer Zugänglichkeit des ATP erfolgt, kann nur durch eine in vivo Phosphorylierung geklärt werden.

Nach 12-stündiger Kultivierung von logarithmisch wachsenden STU 51A-232B Suspensionszellen in ^{32}P-Orthophosphat-haltigem Medium wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 200 g abgeerntet und 1 x mit PBS gewaschen. Danach wurde eine Zelldichte von 5 x 10^7 Zellen/ml eingestellt und ein Teil SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Eine Autoradiographie der ^{32}P-markierten Komponenten wurde angeschlossen.

In beide Phosphoproteine pp 105 und pp 135 wurde ^{32}P-Orthophosphat eingebaut. Eine physiologische Bedeutung der Phosphorylierbarkeit von pp 105 und pp 135 konnte damit abgesichert werden.

Im folgenden wurde noch untersucht, an welche Aminosäuren das ^{32}P-Orthophosphat bei der in vivo Phosphorylierung gebunden war.

Ein Milliliter der ^{32}P-Orthophosphat markierten Zellen wurde 2 x 5 sec. mit Ultraschall (Branson Sonifier, Mikrotip Stufe 3) behandelt, auf 5 mM PCMPS gebracht und in 2 Portionen aufgeteilt. Aus jeweils einer Portion wurde ^{32}P-pp 105 bzw. ^{32}P-pp 135 immunpräzipitiert. Die gewaschenen Immunpräzipitate wurden in 6 N HCl aufgenommen und 4 h bei 105°C unter N_2 hydrolysiert. Die eingeengten Hydrolysate wurden dann dünnschichtelektrophoretisch zur Bestimmung der Phosphoaminosäuren aufgetrennt.

In beiden Phosphoproteinen pp 105 und pp 135 erfolgte eine Phosphorylierung an Serin (ca. 90 %) und Threonin (ca. 10 %). Dies entsprach annähernd den Ergebnissen, die für eine endogene Phosphorylierung der Oberfläche intakter Suspensionszellen (STU 51A-232B) erhalten wurde (35). Bei der Autophosphorylierung von pp 105 wurde jedoch nur an Serin gebundenes Phosphat gefunden.

7.2. Nachweis von pp 105 und pp 135 in Nucleoli

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine Konzentrierung von pp 105 und pp 135 in ringförmig bis fleckenartigen Kernstrukturen. Die Anzahl, Morphologie und Toluidin-Färbbarkeit dieser Kernstrukturen (89) machte eine Identität mit den Nucleoli sehr wahrscheinlich. Es

wurde daher eine Isolierung der Nucleoli aus STU 51A-232B Zellen, modifiziert nach der Methode von Muramatsu et al. (90), vorgenommen. Ein Nachweis von pp 105 und pp 135 in den isolierten Nucleoli erfolgte mit Hilfe der endogenen Phosphorylierung, der Immuntransfertechnik und der Immunfluoreszenzmikroskopie.

Gleiche Proteinmengen der im Verlauf der Nucleoliisolierung erhaltenen Fraktionen (Kernüberstand, Kerne, Nucleoli) wurden unter Standardphosphorylierungsbedingungen 2 min. endogen phosphoryliert. Das Autoradiogramm der SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben ist in Abb. 30 dargestellt. Der Phosphorylierungsgrad der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 korrelierte mit der immunologisch im Immuntransfer nachweisbaren Menge pp 105 und pp 135. Eine Immunfluoreszenzfärbung der isolierten Kerne (Abb. 31a und b) und Nucleoli-Fraktion (Abb. 32a und b) bestätigte die Anwesenheit von pp 105 und pp 135. Es wurde jedoch festgestellt, daß im Verlauf der Kernisolierung trotz Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration auf 5 mM der nicht in den Nucleoli gelegene Zellkernanteil von pp 105 verlorenging. Vergleiche hierzu die immunfluoreszenzmikroskopischen Abbildungen der isolierten Kerne (Abb. 31a) mit in situ gefärbten Kernen (Abb. 29a).Die aus den Kernen verlorengegangene Menge an pp 105 war im Kernüberstand nachzuweisen.

Abb. 30: Autoradiographie endogen phosphorylierter Proben (20 µg Protein) der Nucleolipräparation. ◁ pp105, ◀ pp135 a) Kernüberstand, b) Kerne, c) Nucleoli.

Abb. 31: Immunfluoreszenz von isolierten Kernen aus STU 51A-232B Suspensionszellen. a) anti pp 105 1:50 verdünnt, FITC anti Kaninchen IgG 1:50 verdünnt; b) anti pp 135 1:30 verdünnt, FITC anti Ratten IgG 1:50 verdünnt; Vergrößerung: ca. x 1500.

Abb. 32: Immunfluoreszenz von isolierten Nucleoli aus STU 51A-232B Suspensionszellen; folgend wie in Abb. 31.

Abb. 30

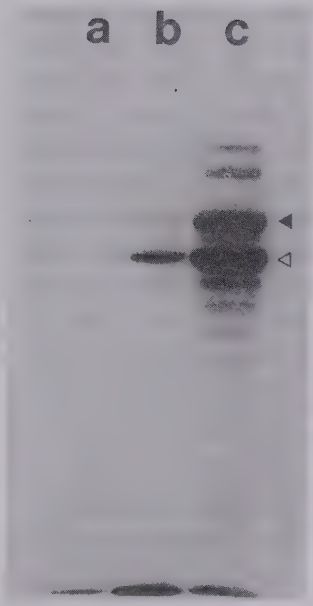


Abb. 31a

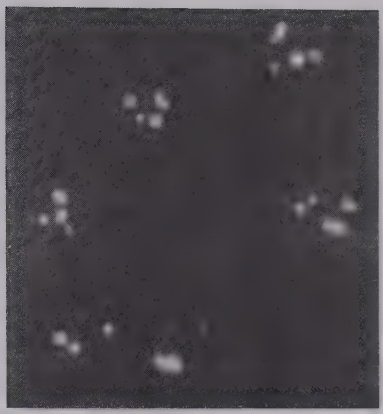


Abb. 32a

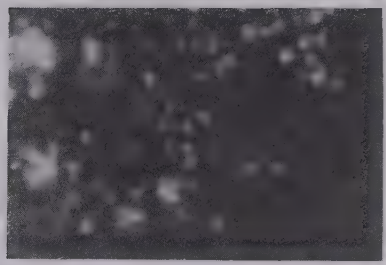
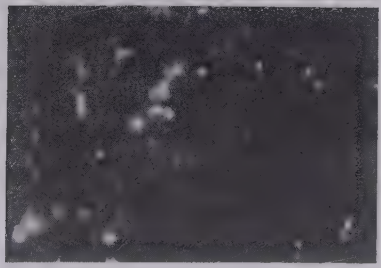


Abb. 31b

Abb. 32b



7.3. Mitogene Aktivität von pp 105

Normale, nicht transformierte Zellen brauchen bestimmte Faktoren, um proliferativ wachsen zu können (91). Diese Faktoren finden sich reichlich in foetalem Serum und sind teilweise bereits charakterisiert. Zu ihnen gehören Peptide wie das Insulin, der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF). Senkt man die Konzentration des foetalen Serums im Kulturmedium unter 1 %, so beenden nichttransformierte Zellen ihr Wachstum an einem hypothetischen Punkt des Zellzyklus, dem Restriktionspunkt der G_1-Phase (92). Transformierte Zellen jedoch lassen sich nicht durch Serumentzug in einer bestimmten Phase des Zellzyklus arretieren. Sie sind unabhängig von äußeren Wachstumsfaktoren, weil sie ihre Wachstumsfaktoren selbst produzieren können (93). Gibt man zu in der G_1-Phase arretierten Normalzellen einen der genannten Wachstumsfaktoren, so beginnen die Zellen erneut, den Zellzyklus zu durchlaufen und sich zu teilen. Neben den physiologischen Wachstumsfaktoren kennt man eine Vielzahl ähnlich wirkender als Mitogene bezeichneter Faktoren. Zu ihnen gehören die Phythämagglutinine (PHA) und die Lipopolysaccharide (LPS) (94).

Die Funktion der in dieser Arbeit an der Oberfläche von Suspensionszellen lokalisierten Phosphoproteine ist unbekannt. In Untersuchungen zur Phosphorylierbarkeit von pp 105 in verschiedenen Wachstumsphasen der Zellen ergab sich eine erhöhte Phosphorylierbarkeit im logarithmischen Wachstum. Es wurde daher in den folgenden Experimenten ein Einfluß von pp 105 auf das Wachstumsverhalten von ruhenden Zellen untersucht.

Zur Wachstumsstimulation durch gereinigtes pp 105 wurden Mäuseembryonalzellen und Mäusethymocyten verwendet. Die Embryonalzellen wurden durch mehrtägigen Serumentzug zur Ruhe gebracht. Die Thymocyten wurden aus frisch entnommenen Mäusethymi präpariert. Die Wachstumsstimulation der Zellen nach Zugabe von pp 105 wurde über den vermehrten ^3H-Thymidineinbau gemessen. Zur Kontrolle wurden Wachstums-

stimulationen mit 5 % foetalem Rinderserum durchgeführt. In Abb. 33 ist der ^{3}H-Thymidineinbau in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge pp 105 / 5 x 10^{4} Zellen (Embryonalzellen und Thymocyten) dargestellt.

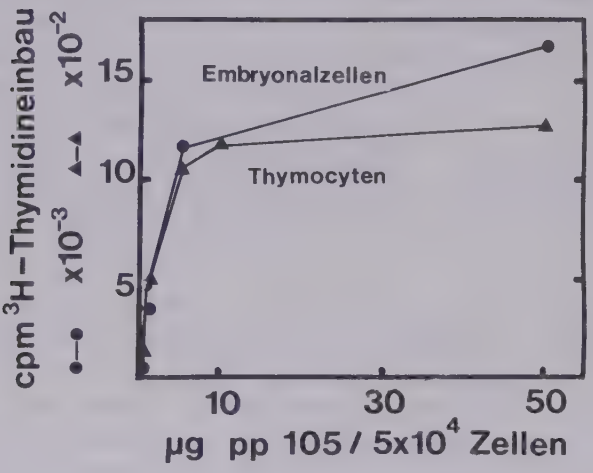


Abb. 33: ^{3}H-Thymidineinbau in Embryonalzellen (●-●) und Thymocyten (▲-▲) in Abhängigkeit von der zugesetzten pp 105 Menge.

Embryonalzellen und Thymocyten waren beide in ihrem Wachstum durch pp 105 stimulierbar. In Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an pp 105 ergab sich für beide Zellen eine typische Sättigungscharakteristik der Wachstumsstimulation. Der maximale ^{3}H-Thymidineinbau erreichte für Embryonalzellen 10 %, für Thymocyten 100 % des ^{3}H-Thymidineinbaus mit 5 % FRS. Der maximale Stimulationsindex (^{3}H-Thymidineinbau einer pp 105 stimulierten gegenüber einer nicht stimulierten Zellprobe) betrug für Embryonalzellen 3, für Thymocyten 7. Halbmaximaler ^{3}H-Thymidineinbau wurde mit 3 x 10^{-11} mol pp 105 / 5 x 10^{4} Zellen (ca. 10^{-8} mol pp 105/l) erhalten.

Da bereits mit sehr geringen Mengen an pp 105 eine Wachstumsstimulation von ruhenden Embryonalzellen und Thymocyten zu verzeichnen war, könnte diesem Ergebnis eine physiologische Bedeutung zukommen. Andere Substanzen jedoch, so auch Proteasen (95), zeigen eine unphysiologische mitogene Aktivität, so daß es weiterer klärender Experimente bedarf, die eine Funktion von pp 105 bei der Wachstumsregulation sicherstellen.

III. ZUSAMMENFASSUNG

Die beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 wurden durch endogene Phosphorylierung intakter Suspensionszellen mit γ^{32}P-ATP an der Oberfläche SV 40 transformierter Mäusefibroblasten (STU 51A-232B), RSV transformierter Mäusefibroblasten (D17/56), SV 40 transformierter Hamsterzellen (K42-A2) und menschlicher HeLa-Zellen gefunden. Die Verteilung der beiden Phosphoproteine in adulten Normalgeweben der Maus erbrachte eine überwiegende endogene Phosphorylierbarkeit mit γ^{32}P-ATP von teilungsaktiven Gewebshomogenaten mesenchymalen Ursprungs (Thymus, Knochenmark, Lymphknoten etc.).

Zur Isolierung der beiden Phosphoproteine wurde eine grobe subzelluläre Fraktionierung SV 40 transformierter Mäusefibroblasten aus Suspensionskultur unter verschiedenen Bedingungen vorgenommen. In Anwesenheit nur geringer Mengen divalenter Kationen befand sich der Hauptteil endogen phosphorylierbaren pp 105 und pp 135 in der cytosolischen Fraktion. Es wurden daher unter diesen Bedingungen beide Phosphoproteine aus endogen phosphoryliertem Cytosol isoliert. Als Anreicherungskriterien galten die ^{32}P-Markierung und das Molekulargewicht. Beide Phosphoproteine konnten mit Hilfe einer Salzfällung, säulenchromatographischer und gelelektrophoretischer Trennmethoden zu 95 % rein dargestellt werden. Der Anteil der beiden Phosphoproteine an den cytosolischen Proteinen ließ sich für pp 105 zu 0.2 %, für pp 135 zu 0.03 % berechnen.

Eine Identität der aus Cytosol isolierten Komponenten mit den an der Zelloberfläche gefundenen Komponenten wurde über partielle proteolytische Spaltmuster der phosphorylierten Komponenten mit V8 Protease sichergestellt. Für diese in vitro Phosphorylierungen der beiden Phosphoproteine wurde aus derselben cytosolischen Fraktion eine Typ II Caseinkinase mit 95 % Reinheit dargestellt und charakterisiert.

Eine Ähnlichkeit der Spaltmuster von pp 105 und pp 135 war nicht gegeben.

Aus Materialgründen konnte eine weitere Charakterisierung der molekularen Eigenschaften nur für pp 105 vorgenommen werden. Gereinigtes pp 105 enthielt 7-9 mol Phosphat pro mol pp 105 und lag in Abwesenheit divalenter Kationen (0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5) überwiegend als Monomer vor. Eine Phosphotransferaseaktivität geringer spezifischer Aktivität (2.9 pmol P_i/h·mg pp 105) konnte nachgewiesen werden. Auch bei Zusatz phosphorylierbarer Substrate (Histon, Casein, Phosvitin) erfolgte eine bevorzugte Eigenphosphorylierung. Optimale Autophosphorylierungsbedingungen wurden bei pH 8.2 - 8.8 und physiologischer Salzkonzentration erhalten. Die Autophosphorylierung erfolgte ausschließlich an Serin und war durch eine regulatorische Untereinheit oder Proteinkinaseinhibitor nicht hemmbar, ebensowenig durch Calmodulin stimulierbar.

Gegen beide Phosphoproteine pp 105 und pp 135 wurden monospezifische Antiseren produziert. Mit Hilfe der Immuntransfertechnik konnte eine halbquantitative Abschätzung der Mengen an pp 105 und pp 135 in den Normalgeweben der Maus vorgenommen werden. In Übereinstimmung mit der endogenen Phosphorylierbarkeit ergab sich ein überwiegendes Vorkommen der beiden Phosphoproteine in lymphatischen Geweben.

Die Lokalisation der beiden Phosphoproteine innerhalb der Zelle und auf der Zelloberfläche wurde immunfluoreszenzmikroskopisch an adhärent und in Suspension wachsenden Zellen untersucht. Ein immunologischer Nachweis von pp 135 an der Oberfläche der untersuchten Zellen war nicht möglich. Für pp 105 konnte eine sehr schwache und nicht auf allen Zellen gleichermaßen starke Immunfluoreszenz an den untersuchten Suspensionszellen (STU 51A-232B), nicht jedoch an den entsprechenden adhäsiv wachsenden Zellen beobachtet werden. Innerhalb interphasischer Zellen waren beide Phosphoproteine ausschließlich im Kern mit einer Konzentrierung, vor allem von pp 135, in den Nucleoli nachzuweisen.

In ersten Versuchen zur Charakterisierung der biologischen Funktionen beider Phosphoproteine wurde nach einer in vivo Phosphorylierung von Suspensionszellen mit ^{32}P-Orthophosphat eine Markierung beider Phosphoproteine erhalten. Die ^{32}P-Markierung fand sich sowohl im Phosphoserin (ca. 90 %) als auch im Phosphothreonin (ca. 10 %), nicht jedoch im Phosphotyrosin.

In isolierten Nucleoli waren beide Phosphoproteine Hauptkomponenten einer endogenen Phosphorylierung mit γ^{32}P-ATP.

In vorläufigen Versuchen zur potentiellen Funktion von pp 105 an der Zelloberfläche intakter Zellen ergab sich eine mitogene Aktivität von gereinigtem pp 105 auf ruhende Mäuseembryonalzellen und Mäusethymocyten mit einem Stimulationsindex von 3 bzw. 7.

IV. DISKUSSION

Proteinphosphorylierungsreaktionen gehören zu den wichtigsten Regulationsmechanismen zellulärer Prozesse (5). Eine Beteiligung von Phosphorylierungsreaktionen an der Etablierung und Aufrechterhaltung des transformierten Zustands einer Zelle konnte nachgewiesen werden (33). Von besonderer Bedeutung sind hierbei durch Phosphorylierung regulierbare Zielproteine und deren biologische Funktion.

Der Zelloberfläche fällt eine wichtige Rolle bei der Zell-Zellkommunikation, der Zelladhärenz, der Zelldifferenzierung und der Wachstumskontrolle zu. Dies alles sind biologische Abläufe, die im transformierten Zustand verändert oder gestört scheinen. In einer vorherigen Arbeit (35) wurden daher Phosphorylierungsreaktionen an der Zelloberfläche intakter SV 40 transformierter Mäusefibroblasten untersucht. Hauptkomponenten der Zelloberflächenphosphorylierung waren zwei Phosphoproteine pp 105 und pp 135. Ähnliche Untersuchungen wurden bereits von anderen Autoren gemacht (22, 36-50). Hierbei wurden eine Vielzahl phosphorylierbarer Oberflächenkomponenten beschrieben, deren biologische Funktion jedoch unbekannt ist.

In dieser Arbeit konnten die beiden Phosphoproteine auch an der Oberfläche anderer Säugetierzellen (RSV transformierte Mäusefibroblasten, SV 40 transformierte Hamsterfibroblasten und HeLa Zellen) durch endogene Phosphorylierung nachgewiesen werden, wenn sie in Suspensionskultur gehalten wurden. Eine Abhängigkeit des Vorkommens der beiden Phosphoproteine von der Zellspezies oder der Art der Transformation schien also nicht gegeben zu sein. Es wurde daher im weiteren untersucht, ob die beiden Phosphoproteine transformationsspezifisch waren. Hierzu wurden Homogenate von Normalgeweben der Maus durch endogene Phosphorylierung und zu einem späteren Zeitpunkt auch durch Immuntransfertechniken auf Vorkommen und Verteilung der beiden Phosphoproteine untersucht.

Die Intensität der immunologischen Reaktion im Immuntransfer korrelierte gut mit der endogenen Phosphorylierbarkeit der beiden Phosphoproteine. Der Grad der endogenen Phosphorylierbarkeit von pp 105 und pp 135 war darum eher als ein Maß für die Menge der beiden Phosphoproteine, als ein Maß für die Aktivität der beteiligten Kinasen u./o. Phosphatasen in den jeweiligen Gewebshomogenaten anzusehen.

Es zeigte sich, daß die beiden Phosphoproteine nicht nur in transformierten Zellen, sondern auch vor allem in teilungsaktiven Geweben mesenchymalen Ursprungs vorkamen. Relativ große Mengen der beiden Phosphoproteine ließen sich jedoch auch im Gehirn nachweisen, so daß eine direkte Beteiligung an Zellteilungsprozessen unwahrscheinlich scheint. Im Vergleich zu den adulten Normalgeweben der Maus war der Gehalt an pp 105 und vor allem an pp 135 in embryonalen und transformierten Mäusezellen erhöht. Eine Beteiligung der Phosphoproteine an biologischen Funktionen, die für ein proliferatives Wachstum der Zellen gebraucht werden, ist daher wahrscheinlich. In ähnlichen Untersuchungen fanden Malkinson et al. (23) nach endogener Phosphorylierung von Gewebshomogenaten ein Phosphoprotein mit 135 KD, welches kaum in adulten, jedoch stark in foetalen Geweben und Tumoren phosphoryliert wurde. Dasselbe 135 KD Phosphoprotein war auch nach Stimulierung von Lymphocyten mit Concanavalin A stark phosphorylierbar (96). Ebenso fanden Wu et al. (97) in Novikoff Hepatomen, nicht jedoch in regenerierender Leber oder Normalleber, ein cytosolisches 140 KD Phosphoprotein, welches mit obigem 135 KD Phosphoprotein und dem in dieser Arbeit isolierten pp 135 identisch sein könnte.

Ein dem pp 105 vergleichbares foetales Phosphoprotein mit 110 KD wurde ebenfalls in der Arbeit von Malkinson et al. (23) beschrieben.

Zur Isolierung der beiden Phosphoproteine pp 105 und pp 135 wurde eine Zellfraktionierung in Anwesenheit nur geringer Mengen divalenter Kationen vorgenommen. Der Hauptteil bei-

der Phosphoproteine befand sich unter diesen Bedingungen im Cytosol, aus dem eine Reinigung unter Verwendung Sulfat- und Phosphat-haltiger Puffer vorgenommen wurde. Durch Vermeidung divalenter Kationen konnten Aggregationen der sauren Phosphoproteine vermieden werden, die zu großen Schwierigkeiten bei der Isolierung führen können (98).

Die Reversibilität der meisten Phosphorylierungsreaktionen führt zu einem schnellen Verlust der ^{32}P-Markierung von Phosphoproteinen. Als äußerst effektiver Proteinphosphatasehemmer erwies sich p-Chloromercuriphenylsulfonat (PCMPS), welches eine Erhaltung der ^{32}P-Markierung unter schonenden Bedingungen ermöglichte.

Eine weitere Charakterisierung molekularer Eigenschaften wurde aus Materialgründen nur für pp 105 vorgenommen. Hierbei konnte eine Kinaseaktivität sehr geringer spezifischer Aktivität nachgewiesen werden. Eine Verunreinigung von pp 105 durch Kinase ließ sich weitestgehend ausschließen. Die gefundene geringe spezifische Aktivität könnte bedingt sein durch einen Aktivitätsverlust während der Reinigung, durch das Fehlen geeigneter Effektoren oder durch das Fehlen des geeigneten physiologischen Substrats. Auf Grund der relativ großen Mengen von pp 105 im Zellkern scheint es fraglich, ob die Kinaseaktivität die einzige biologische Funktion von pp 105 darstellt.

Für immunologische Nachweise der beiden Phosphoproteine wurden monospezifische Antiseren produziert. Mit immunfluoreszenzmikroskopischen Techniken ergab sich in Übereinstimmung mit der endogenen Phosphorylierung eine fast ausschließliche Lokalisation der beiden Phosphoproteine innerhalb der Zelle.

An der Zelloberfläche von STU 51A-232B Suspensionszellen konnte nur sehr wenig pp 105, dagegen kein pp 135 nachgewiesen werden. Eine physiologische Bedeutung solch geringer Mengen an der Zelloberfläche bleibt nach wie vor offen. Die Möglichkeit einer unspezifischen Adsorption von aus geschädigten Zellen freigesetzten Kinasen und ihren Substraten an

der Oberfläche intakter Zellen kann bislang nicht ausgeschlossen werden.

Die immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von pp 105 war von den gewählten Fixierungsbedingungen abhängig. In Übereinstimmung mit der Verteilung von pp 105 bei der subzellulären Fraktionierung fand sich bei einstufigen Fixierungsmethoden ohne Zusatz divalenter Kationen das meiste pp 105 im Cytoplasma mit cytoskelettalen Strukturen assoziiert. Erst bei Zusatz divalenter Kationen oder Anwendung zweistufiger Fixierungsmethoden mit Glutardialdehyd oder Formaldehyd gefolgt von einer Membranpermeabilisierung durch Methanol war eine ausschließliche Lokalisation im Kern zu finden. Ein ähnliches Diffusionsverhalten ist für das lösliche Kernprotein Nucleoplasmin beschrieben (88).

Beide Phosphoproteine, insbesondere pp 135, zeigten eine starke Anreicherung in den Nucleoli. Ein Vergleich mit bekannten nucleolären Phosphoproteinen (99) erbrachte große Ähnlichkeiten von pp 105 mit einem nucleolären Phosphoprotein C23 aus Novikoff Hepatomzellen (100, 101) und einem 110 KD Phosphoprotein aus Maus Ascites Sarkomzellen (102).

Ähnlichkeiten ergaben sich für folgende Eigenschaften:
- Phosphorylierbarkeit
- Molekulargewicht
- isoelektrischer Punkt, welcher für pp 105 zu 4,5 - 5,0 bestimmt wurde (persönliche Mitteilung T. Achtstätter)
- Elutionsverhalten von Hydroxylapatit
- hohe proteolytische Empfindlichkeit.

Im Unterschied zu Phosphoprotein C23 (99) war pp 105 in vivo neben Serin auch an Threonin phosphoryliert. Der Unterschied könnte jedoch auch auf die verschieden verwendeten Zellen zurückzuführen sein. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an C23 wurden nach einer einstufigen Acetonfixierung durchgeführt (103). Die Immunfluoreszenzdarstellungen von C23 entsprachen unter diesen Bedingungen weitestgehend denen von pp 105. Wie jedoch in der vorliegenden Arbeit ausgeführt wurde, kam es unter diesen Fixie-

rungsbedingungen zu einer artifiziellen Verteilung von pp 105. Die aus der Immunfluoreszenzverteilung von C23 abgeleitete Interpretation (103) einer Transportfunktion des C23 von den Nucleoli zur Kernmembran scheint daher sehr fraglich. Da Phosphoprotein C23 mit präribosomalen Partikeln assoziiert vorgefunden wurde (104), wird eine Beteiligung am Zusammenfügen und beim Reifungsprozeß präribosomaler RNA diskutiert (103). Ein nucleoläres Phosphoprotein mit 135 KD scheint bisher unbekannt zu sein.

Beide Phosphoproteine pp 105 und pp 135 wurden in vivo phosphoryliert. Es ist daher zu erwarten, daß ihre biologische Funktion durch eine reversible Phosphorylierung/Dephosphorylierung gesteuert wird. Eine in vitro-Phosphorylierung isolierter Nucleoli führte zu einer starken endogenen Phosphorylierung beider Phosphoproteine. Eine Beteiligung an nucleolären Funktionen ist daher sehr wahrscheinlich. Die erhöhten Mengen an pp 105 und pp 135 in embryonalen und transformierten Zellen könnten daher eine Folge der erhöhten biosynthetischen Aktivität der Nucleoli in diesen Zellen sein (89). Die physiologische Bedeutung einer Lokalisation der beiden Phosphoproteine auf der Oberfläche von Suspensionszellen sowie die mitogene Aktivität von pp 105 bedürfen einer weiteren Klärung.

V. MATERIAL UND METHODEN

1. Zellen und Zellkultur

Folgende Zell-Linien wurden benutzt: STU 51A-232B Mäusefibroblasten (52), eine Sublinie SV-40 transformierter Embryonalzellen von STU-Mäusen (51), STU-D1756 Mäusefibroblasten, eine Sublinie Rous Sarkom Virus (Schmidt-Ruppin Stamm) transformierter Embryonalzellen von STU-Mäusen, K42-A2 Hamsterfibroblasten, eine Sublinie eines SV-40 induzierten Hamstertumors und HeLa (S3 Stamm, Flow Laboratories, Bonn).

Diese Zellen wuchsen adhäsiv in DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum (FRS) auf Plastikschalen. Die Anfangszelldichte betrug ca. 1-2 x 10^4 Zellen/cm^2.

Suspensionskulturen dieser Zellen erhielt man in DMEM ohne Calcium mit 10 % hitzeinaktiviertem FRS. Die Anfangszelldichte lag bei ca. 1 x 10^6 Zellen/ml. Logarithmisches Wachstum der Zellen wurde bei ca. 2-3 x 10^6 Zellen/ml durch geeignete Verdünnung mit frischem Medium erhalten.

Embryonalzellen wurden aus ca. 18-tägigen fetalen STU-Mäusen gewonnen. Hierzu wurden die Feten nach Entfernung von Kopf, Extremitäten und Innereien in kleine Stückchen geschnitten, die nach PBS-Wasch 10 min. in Trypsin-EDTA (0.25 % Trypsin, 0.05 % EDTA in PBS, pro 400 ml 1 ml 1 N NaOH) bei Raumtemperatur gerührt wurden. Nach 5-minütiger Zentrifugation (200 g) der so behandelten Gewebsstückchen wurde das Sediment in DMEM/10 % hitzeinaktiviertem FRS aufgenommen und auf Plastikschalen verteilt. Für Untersuchungen wurden Zellen nach der 1. bis zur 6. Passage verwendet.

Thymocyten wurden aus den Thymi von 6-8 Wochen alten STU-Mäusen durch Douncen in PBS, 5-minütiger Zentrifugation bei 500 g und Aufnahme des Sediments in RPMJ Medium erhalten.

2. Standardphosphorylierungsbedingungen

2.1. Zellhomogenate und -fraktionen

10 µl 0.5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.8 (37°C) und 10 µl 0.1 M $MgCl_2$ wurden mit 50 µl Probe (100-150 µg Protein) 1 min bei 37°C vorinkubiert. Die Phosphorylierung wurde mit 30 µl γ^{32}P-ATP (= 30 µCi) in H_2O gestartet. Nach den jeweils angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 50 mM Phosphatpuffer/50 mM EDTA (pH 7.2), 5 % SDS, 5 % β-Me, 50 % Glycerol und 5 min. Erhitzen bei 95°C abgestoppt.

2.2. Intakte Zellen

Suspensionszellen wurden durch 1-minütige Zentrifugation bei 100 g sedimentiert und 2 x mit warmem isotonem Ganzzellphosphorylierungspuffer (GZPP, DMEM ohne Ca^{2+} und Ersatz des Natriumcarbonatpuffers durch isoosmotische Mengen an Natriumphosphatpuffer pH 7.2 bei 37°C) gewaschen. Die Phosphorylierung erfolgte bei 37°C, indem 50 µl einer Zellsuspension (1 x 10^6 Zellen) in GZPP mit 50 µl (= 50 µCi) γ^{32}P-ATP (γ^{32}P-GTP) in GZPP 3 min. geschüttelt wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0.1 M Phosphatpuffer/0.1 M EDTA (pH: 7.2), 10 % SDS, 10 % β-Me und 5 min. Erhitzen bei 95°C abgestoppt. Danach wurden die Proben auf 10 % Glycerol gebracht.

3. Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Analysen wurden in dem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (66) mit und ohne SDS vorgenommen. Der in den Legenden zu den jeweiligen Gelen angegebene Prozentsatz an Acrylamid wurde mit einer Stammlösung aus 30 % Acrylamid/0.8 % N,N-Methylen-bisacrylamid hergestellt.

Die analytischen Gele (13 x 11 cm) hatten eine Dicke von 1.5 mm, die präparativen von 3 mm und 5 mm.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Proben wurden die Gele in der Regel 15 min. mit Entfärber fixiert (Methanol:Essigsäure:H_2O, 5:1:5), 30 min. mit 0.25 % Coomassie Brilliant Blue R250 in Entfärber gefärbt und ca. 2 h mit Entfärber entfärbt. Fixierung, Färbung und Entfärbung erfolgten bei 50°C unter Schütteln. Zur weiteren Entfärbung und Rehydrierung wurden die Gele in 7 % Essigsäure geschüttelt.

4. Autoradiographie

Zur Detektion markierter Proteine wurden die bei 80°C unter Vakuum (Gel Slab Dryer, Model 224, Bio Rad) getrockneten Gele mit einem Kodak X-Omat-AR Film und einer Dupont Cronex Quanta III Verstärkerfolie bei -70°C exponiert. Die exponierten Filme wurden in Roentogen (Tetenal) entwickelt, in essigsaurem H_2O zwischengewässert und in Fixierlösung (200 g $Na_2S_2O_3$ mit 20 g $K_2S_2O_5$ auf 1 l H_2O) fixiert.

5. Quantifizierung des ^{32}P-Einbaus in pp 105 und pp 135

Die nach Autoradiographie der getrockneten Gele detektierten ^{32}P-markierten pp 105 und pp 135 Banden wurden ausgeschnitten, mit 50 µl H_2O gequollen und 2 h bei 50°C mit 0.5 ml NCS-Gewebe-Löser (Amersham Searle) inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Toluol-Szintillator (25 g PPO, 0.5 g POPOP auf 5 l Toluol) wurde in einem Beckman Flüssigkeits-Szintillationsgerät (Modell LS 7500) ausgezählt.

6. Isolierung der Phosphoproteine pp 105 und pp 135

6.1. Cytosolpräparation

Siehe Kapitel II, 2.2. und 2.3.; N_2-Dekompression: Parr-Instruments CO. - 920 ml

6.2. Detektion Phosphoprotein-haltiger Fraktionen

Endogen mit γ^{32}P-ATP phosphoryliertes Cytosol wurde als interne Phosphorylierungsmarkierung vor der säulenchromatographischen Reinigung zugesetzt. Phosphoprotein-haltige Fraktionen wurden detektiert, indem 50 µl der einzelnen Fraktionen in 5 ml Toluol-Szintillator (Kap. 5) ausgezählt wurden. Eine weitere Analyse der Phosphoproteine erfolgte durch SDS-gelelektrophoretische Auftrennung und autoradiographische Identifizierung (siehe Kap. II,3.1).

6.3. Säulenchromatographische Verfahren

Zur Markierung der Phosphoproteine mit ^{32}P wurde 1 ml Cytosol unter Standardphosphorylierungsbedingungen 5 min. phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 50 mM PCMPS und 200 µl 100 mM EDTA abgestoppt. Proteinmenge und Volumen wurden durch Zugabe von 14.4 ml unmarkiertem Cytosol, 2 ml 1 M Tris-Cl pH 7.5, 1 ml 50 mM PCMPS, 100 µl 200 mM PMSF (in Ethanol) und 200 µl 100 mM EDTA vergrößert.

Die folgenden Isolierungsschritte wurden bei 4°C ausgeführt.

Unmarkiertes Cytosol (350 ml) in 0.1 M Tris-Cl pH 7.5/ 0.1 mM ATP/0.2 mM PMSF und markiertes Cytosol (20 ml) wurden getrennt zwischen 40-70 % Ammonsulfatsättigung fraktioniert gefällt. Die Sedimente wurden vereint in 30 ml 50 mM Tris-Sulfat/0.1 M Ammonsulfat pH 7.5 (Puffer B)/2 mM PCMPS aufgenommen und über Nacht gegen 150 Volumen Puffer B dialysiert. Die dialysierten Sedimente wurden dann auf eine mit Puffer B äquilibrierte DEAE-Sepharose-Säule (1.8 x 48 cm) aufgetragen. Nachdem mit 5 Säulenvolumen Puffer B nachgewaschen worden war, erfolgte die Elution mit einem Salzgradienten (1 l) ansteigender Ammonsulfatkonzentration bis 0.8 M.

Die pp 105 und pp 135-haltigen Fraktionen wurden jeweils getrennt auf eine mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule (HTP Bio Rad, 1 x 15 cm) aufgetragen und stufenweise mit 0.05 M, 0.2 M und 1.5 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 für pp 105, 0.05 M, 0.5 M und 1.5 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 für pp 135 eluiert.

Die jeweiligen pp 105 und pp 135-haltigen Fraktionen (1.5 M) wurden getrennt auf jeweils eine mit 1.5 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 äquilibrierte Phenylsepharose-Säule (1 x 20 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte jeweils mit einem Gradienten (400 ml) absteigender Phosphatkonzentration. Die pp 105 und pp 135-haltigen Fraktionen wurden gegen 150 Volumen H_2O dialysiert und anschließend lyophilisiert.

6.4. Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese für pp 135

Das pp 135-haltige Lyophilisat wurde in 1 ml H_2O mit 100 µl 0.1 M Phosphatpuffer/0.1 M EDTA (pH 7.2), 10 % SDS, 10 % β-Me 5 min. bei 100°C inkubiert. Die Probe wurde dann auf 10 % Glycerol/0.004 % Bromphenolblau eingestellt und auf einem Polyacrylamidgel (130 x 110 x 3 mm) aufgetrennt.

Nach Anfärbung des Gels in 1 %iger wässriger Coomassie-Brilliant-Blue R250 Lösung und Entfärbung in H_2O wurde die pp 135 Proteinbande herausgeschnitten und gelelektrophoretisch wie in Kap. 12 beschrieben eluiert.

6.5. Bestimmung der Anreicherung von pp 105 und pp 135

Der Proteingehalt von Proben der jeweiligen Anreicherungsstufen (teilweise nach Konzentrierung über Ammonsulfatfällung) wurde nach der Methode von Lowry et al. (105) bestimmt. Aliquote Teile der Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, die pp 105 und pp 135 Banden nach autoradiographischer Lokalisation herausgeschnitten und der ^{32}P-Einbau, wie in Kap. 5 beschrieben, bestimmt. Die Anreicherungsfaktoren wurden aus den so ermittelten spezifischen Aktivitäten (^{32}P-Einbau in pp 105 bzw. pp 135/Gesamtprotein der gelelektrophoretischen Auftrennung) berechnet. Aus den in den einzelnen Reinigungsschritten wiedergefundenen ^{32}P-Markierungen von pp 105 (pp 135) ließen sich die jeweiligen Ausbeuten ermitteln.

7. Proteinbestimmungen

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (105) oder Bradford (106) durchgeführt.

8. Isolierung einer cytosolischen Phosvitinkinase

8.1. Kinasetest

Zu einer Mischung aus 20 µl 0.5 M Natriumphosphatpuffer pH 7.8 (37°C), 20 µl 0.1 M $MgCl_2$, 10 µl Phosvitin (10 mg/ml), 2 µl 1 mM ATP (= 1 µCi) wurden 50 µl Probe zugesetzt und 5 min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 ml 10 % TCA/20 mM Pyrophosphat abgestoppt, als Trägerprotein wurde 1 Tropfen RSA (5 mg/ml) zugesetzt. Nach Absaugen des gefällten Reaktionsgemischs über Glasfilterchen (GF/C, Whatman) erfolgte zweimaliges Waschen mit jeweils 5 ml 10 % TCA/20 mM Pyrophosphat. Die Glasfilterchen wurden 30 min. bei 100°C getrocknet und dann mit 10 ml Toluolszintillator (siehe Kap. 5) im Szintillationszähler gemessen.

8.2. Reinigungsschritte

Die Reinigung erfolgte bei 4°C. Das Sediment einer 40 %igen Ammonsulfatfällung von Cytosol (siehe Kap. II,2.2. und 2.3.) wurde in 25 mM Tris-Cl pH 7.5 (Puffer C) gelöst und gegen denselben Puffer über Nacht dialysiert. Von ausgefallenem Material wurde abzentrifugiert und der Überstand einer Chromatographie an einer mit Puffer C äquilibrierten DEAE-Sepharose-Säule (1.8 x 48 cm) unterzogen. Nachdem mit 5 Säulenvolumen nachgewaschen worden war, erfolgte die Elution mit einem Gradienten (1 l) steigender NaCl Konzentration (0 - 0.6 M).

Die Kinase-haltigen Fraktionen wurden auf eine mit Puffer C äquilibrierte Phosphocellulose-Säule (2.3 x 43 cm) aufgetragen, mit mehreren Säulenvolumen Puffer C nachgewaschen und dann mit einem Gradienten (1 l) ansteigender Ionenstärke (0-1 M) eluiert.

Die aktiven Fraktionen wurden auf eine mit Puffer C äquilibrierte Phosvitin-Sepharose-Säule (1 x 20 cm) aufgetragen

und in Stufen mit 0.05 M, 0.1 M und 0.2 M Kaliumphosphatpuffer eluiert. Die Kinaseaktivität eluierte im letzten Schritt.

9. Herstellung von Adsorbentien für Affinitätschromatographie

9.1. Aktivierung von Sepharose 4B

Sepharose 4B wurde entweder mit CNBr nach der Methode von Porath et al. (Prozedur C, 107) aktiviert oder präaktiviert von Pharmacia bezogen.

9.2. Kupplung

Die Kupplung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Pharmacia, 108). Die Kupplungseffizienz wurde durch Proteinbestimmung im Überstand vor und nach Kupplung ermittelt und betrug ca. 90 %.

10. Spaltungen mit Staphylococcus aureus V 8 Protease (109)

Gereinigtes pp 105, angereichertes pp 135 sowie intakte Zellen wurden unter Standardphosphorylierungsbedingungen mit gereinigter cytosolischer Kinase phosphoryliert. Die phosphorylierten und mit SDS/ß-Me haltigem Probenpuffer denaturierten Proben wurden im 7.5 %igen SDS-Gel mit 9 mm breiten Taschen aufgetrennt, die pp 105 und pp 135 Banden autoradiographisch im feuchten Gel lokalisiert, ausgeschnitten und 10 min. in 0.125 M Tris-Cl pH 6.8, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA inkubiert. Die inkubierten Gelstückchen wurden gedrittelt

und in 3 mm breite Taschen eines zweiten 15 %igen SDS-Gels mit verlängertem Obergel (6 cm) geschoben. Nach Überschichtung der Gelstückchen mit 5 µl Staph. aureus V8 Protease (0.4, 4, 20, 80 und 400 µg/ml 0.125 M Tris-Cl pH 6.8, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA und 20 % Glycerol) wurden die Proben bei 100 V bis an die Grenze zum Trenngel elektrophoriert und dort 30 min lang angehalten. Danach erfolgte eine Auftrennung der partiell gespaltenen Proben im Trenngel. Die entstandenen und aufgetrennten Phosphopeptide wurden nach Trocknen des Gels autoradiographisch lokalisiert.

11. Bestimmung der Glucose-6 Phosphat - Dehydrogenase-Aktivität

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde im optischen Test nach Bergmeyer (110) durchgeführt.

12. Gelelektrophoretische Elution von Proteinen (67)

Das im SDS-Gel (3 mm) aufgetrennte Proteingemisch wurde mit 1 %iger wässriger Coomassie Brilliant Blue R250 Lösung kurz gefärbt, mit H_2O entfärbt und die gewünschte Proteinbande herausgeschnitten.

Die herausgeschnittene Proteinbande wurde in 0.2 % Bromphenolblaulösung kurz angefärbt, auf ein 5 %iges Trägergel (5 mm) in Laemmli-Elektrophorese-Puffer (66) ohne SDS gelegt, in 1 %iger Agarose (in Obergelpuffer) eingebettet und dann mit Obergel (4 cm nach Laemmli (66)) ohne SDS überschichtet. Der Elektrophoresepuffer wurde ohne SDS verwendet. Das elektrische Feld wurde umgepolt, so daß das Protein in das Obergel hineinwanderte und sich dort mit der Bromphenolblaubande konzentrierte. Kurz bevor die Bromphenolblau-Proteinbande aus dem Obergel herauswanderte, wurde mit

40 % Glycerol in Obergelpuffer ohne SDS überschichtet. Nach weiterer elektrophoretischer Elution wurde die Überschichtung mit enthaltenem Protein abgezogen, gegen H_2O dialysiert und lyophilisiert.

13. Bestimmung des Phosphatgehalts von Proteinen

Zur Entfernung anorganischen Phosphats wurde das Protein mit 10 % TCA gefällt. Das jeweils mit Ultraschall suspendierte Sediment wurde noch 3 x mit 10 % TCA gewaschen und dann in 15 % Ameisensäure bei 95°C gelöst. Hiervon wurden dann Proben für die Protein- und Phosphatbestimmung bei 95°C zur Trockene eingedampft. Zu den Proben und Eichkurven-Standards der Phosphatbestimmung wurde jeweils 100 µl Veraschungslösung (60 µl 65 % HNO_3, 20 µl 70 % $HClO_4$, 20 µl 10 N H_2SO_4) zugesetzt und 10 min bei 120-130°C erhitzt. Nach weiteren 30 min. bei 180-190°C wurden die Proben abgekühlt, in 100 µl H_2O aufgenommen und dann mit 800 µl Farblösung (111) gemischt. Nach 1-minütiger Inkubation wurden 100 µl 34 %ige Zitronensäure (w/v) zugesetzt. Nach weiteren 20 min. wurde die Extinktion bei 650 nm abgelesen.

Farblösung: 3 Teile 0.045 % Malachitgrünhydrochloridlösung in H_2O werden mit 1 Teil 4.2 % Ammoniumheptamolybdatlösung in 4 N HCl 20 min. geschüttelt. Nach Filtration durch ein Sterilfilter (0.2 µm, Schleicher & Schüll) werden auf 5 ml Farblösung 100 µl Triton-X-100 (2 %) gegeben.

14. Analyse der Phosphoaminosäuren

Die phosphorylierten Proben wurden mit eiskalter 20 % TCA gefällt, 2 x mit 20 % TCA, 1 x mit Ethanol und 1 x mit Ethanol:Diethylether (1:1) nachgewaschen. Die Sedimentation der Präzipitate erfolgte jeweils für 15 min in der Eppen-

dorfzentrifuge (8000 g). Die Sedimente wurden in 500 µl 6 N HCl aufgenommen, bei 100°C in Lösung gebracht, in Glasröhrchen unter N_2-Atmosphäre eingeschmolzen und 4 h bei 105°C hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit N_2 zur Trokkene eingeengt und in H_2O aufgenommen. Ein Teil der Proben wurde zusammen mit jeweils 3 µg Marker (P-Ser, P-Thr und P-Tyr) auf eine Cellulose DC-Platte (Merck) aufgetragen. Als R_f-Marker wurde Orange G verwendet. Die DC-Platte wurde mit Elektrophoresepuffer (Essigsäure:Pyridin:H_2O, 50:5:945 (112)) eingesprüht und 2 h bei 1000 V, -5°C mit einer Glasplatte abgedeckt elektrophoriert. Die Phosphoaminosäuremarker wurden durch Besprühen mit Ninhydrinreagenz (100 ml 4 M Natriumacetat, pH: 5.5, 300 ml Ethylenglykolmonomethylether, 8 g Ninhydrin, 160 mg Zinn(II)-chlorid) und Erhitzen auf 100°C sichtbar gemacht.

15. Produktion und Reinigung von Antiseren

15.1. Immunisierung der Tiere und Blutentnahme

Vor der Immunisierung wurde den Tieren Präimmunserum als Kontrolle entnommen. Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte durch Injektion einer Emulsion von 1 mg Antigen in 1 ml PBS : Komplettem Freund'schen Adjuvans (KFA) (1:1) (DIFCO) in Mengen von je 100 µl Emulsion in die poplitealen Lymphknoten; die restlichen 800 µl wurden auf mehrere Stellen subcutan über den Rücken verteilt. Nach 2 Monaten erfolgte eine Zweitimmunisierung mit 1 mg Antigen in 1 ml PBS:Inkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA) (1:1) (DIFCO) durch subcutane Verteilung über den Rücken. Nach 10 Tagen wurden 40 ml Blut aus der Ohrvene entnommen.

Ratten wurden immunisiert, indem 300 µg Antigen in einer Emulsion von 500 µl PBS:KFA (1:1) zu einem Drittel intraperitoneal und zu zwei Drittel subcutan über den Rücken ver-

teilt injiziert wurden. In Abständen von 6-8 Wochen wurde eine Zweit- und Drittimmunisierung mit jeweils 250 µg Antigen in 500 µl PBS:IFA (1:1) zu einem Drittel intraperitoneal und zu zwei Drittel subcutan in den Rücken vorgenommen. Nach der Zweitimmunisierung wurden in Abständen von jeweils einer Woche 2 ml Blut über das Auge entnommen.

15.2. Gewinnung und Lagerung der Seren

Das entnommene Blut wurde über Nacht bei 4°C stehen gelassen und dann entweder 2 min. in der Eppendorfzentrifuge (8000 g) oder 30 min. bei 1500 g (Stock) abzentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde in Portionen für eine längerfristige Lagerung bei -20°C eingefroren oder einmal aufgetaut bei 4°C in 0.02 % Merthiolat oder 0.02 % Na-azid aufbewahrt.

15.3. Reinigung der Antiseren

a) Gewinnung von IgG (113)

Zu 40 ml Kaninchenserum wurden 20 ml eiskaltgesättigter Ammonsulfatlösung zugesetzt. Nach 30 min. wurde der Niederschlag 30 min bei 30 000 g sedimentiert. Das Sediment wurde in 20 ml H_2O aufgenommen und die Fällung mit 10 ml eiskaltgesättigter Ammonsulfatlösung wiederholt. Das nach Zentrifugation erhaltene Sediment wurde in ca. 5 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0 aufgenommen und über Nacht gegen denselben Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (1.8 x 48 cm) aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert. Das eluierte IgG wurde über eine Ammonsulfatfällung konzentriert und gegen PBS/0.02 % Na-Azid dialysiert.

b) Affinitätschromatographische Reinigung von Antikörpern

Sepharose 4B (1 ml) mit 500 µg gekoppeltem Antigen (siehe Kap. 9.2.) wurde mit 500 µl Immunserum und 2.5 ml Waschpuffer (0.1 M Tris-Cl pH 8.0 (4°C), 0.5 M NaCl) bei 4°C über Nacht geschüttelt. Das Gel wurde in ein Säulchen (0.6 x 5 cm) gefüllt, mit 5 ml Waschpuffer gespült und mit 0.1 M Glycin-HCl pH 2.5 eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 1/10 Volumen 1 M Tris-Cl pH 8.8 auf einen pH von ca. 7.5 gebracht. Teilweise wurden die eluierten Antikörper nach Dialyse gegen entsprechend verdünntes PBS durch Lyophilisation eingeengt.

16. Immunologische Techniken

16.1. Immuntransfer (Western-Blot (83))

Die Ermittlung der Spezifität von Immunseren sowie die Identifizierung eines Antigens in Rohextrakten erfolgte mit Hilfe der Immuntransfertechnik.

Das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde vor dem Transfer 15 min. in Transferpuffer (20 mM Tris, 0.15 M Glycin, 20 % Methanol) unter Schütteln inkubiert. Das SDS-Gel mit einem blasenfrei aufgelegten Bogen Nitrocellulose (BA 83, 0.2 µm, Schleicher & Schüll) wurde zwischen zwei Bogen Whatmann 3MM Papier und zwei zurechtgeschnittenen Stücken Dunstfilter (Melitta) eingeklemmt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose erfolgte zwischen zu einer Fläche ausgespannten Platinelektroden in Transferpuffer bei 10 V/cm über Nacht.

Die folgenden Inkubationen erfolgten alle unter Schütteln. Zunächst wurde der Nitrocellulosebogen zur Absättigung noch freier Bindungsstellen 30 min. bei 40°C in Waschpuffer (10 mM Tris-Cl pH 7.0, 0.15 M NaCl), 10 % FRS, 3 % RSA (Fraktion V, Sigma) nach Zugabe einer entsprechenden Menge

Immunserum (meist 1:200 Endkonzentration) für weitere 60 min. bei 40°C inkubiert. Danach wurde der Nitrocellulosebogen 5 x je 5 min. bei R.T. mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten peroxidasegekoppelten Antikörper (meist 1:1000 Endkonzentration) erfolgte 2 h bei R.T. in Waschpuffer, 10 % FRS, 3 % RSA. Nach dem Waschen (5 x) in Waschpuffer für jeweils 5 min. wurde die Peroxidasefärbereaktion in einem frisch angesetzten Gemisch aus 20 ml 25 mM Tris-Cl pH 7.5, 4 ml (4)-Chloro-(1)naphthol (3 mg/ml in Methanol, Merck, bei -20°C begrenzt haltbar) und 8 µl H_2O_2 (30 %) vorgenommen.

Mit dem 1. Antikörper reagierende Proteinbanden färbten sich blau-violett.

16.2. Immundiffusion nach Ouchterlony (114)

In 35 mm Petrischälchen wurden 2.5 ml 1 % Agarose/4 % Polyethylenglykol 6000 / 0.02 % Na-azid in PBS gegossen. Mit einer Metallschablone wurden in das Agarosegel Löcher eingestanzt, in die jeweils 10 µl Lösung (5-10 µg Antigen und Serum bzw. Serumverdünnungen) einpipettiert wurden. Die Diffusion erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Immunpräzipitate ließen sich im Schräglicht erkennen. Zur Anfärbung wurde zwei Tage in PBS/0.02 % Na-azid mit mehrmaligem Wechsel inkubiert, mit 0.25 % Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt und in 7 % Essigsäure entfärbt.

16.3. Immunpräzipitation (115)

Es wurden 1 x 10^7 Zellen/ml mit Ultraschall (Branson Sonifier, Mikrotip, Stufe 3, 3 x 15 sec) aufgeschlossen und 1 min. unter Standardphosphorylierungsbedingungen phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe 1/10 Volumen 50 mM PCMPS abgestoppt.

Nach 30-minütiger Zentrifugation (10 000 g) des phosphorylierten Zellhomogenats wurden zu 100 µl Überstand 5 µl Antiserum gegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Zusatz von 20 µl einer vorgewaschenen 10 %igen Suspension Staphylococcus aureus (Pansorbin, Calbiochem) in RIPA Puffer (1 % Triton X-100/1 % Na-deoxycholat/0.1 % SDS/0.15 M NaCl/ 0.02 M Tris-Cl pH 7.2) wurde für weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Es wurde zentrifugiert (1 min, 8000 g, Eppendorfzentrifuge) und der Niederschlag noch 3 x mit RIPA Puffer und 1 x mit 25 mM Tris-Cl pH 7.5 gewaschen.

16.4. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

16.4.1. Vorbereitung der Proben

a) adhäsiv wachsende Zellen

Die Zellen wurden 1-3 Tage vor Gebrauch auf runde Deckgläschen (12 mm Ø, Dicke 0.16 mm) ausgesät.

b) Suspensionszellen, Kerne und Nucleoli

Suspendiertes Material wurde an mit Polylysin (100 µg/ml, MG 70-150 000, Sigma) beschichtete Objektträger adsorbiert. Die Behandlung erfolgte im weiteren wie für adhärent wachsende Zellen. Vor der Inkubation mit Antikörpern mußten die noch freien Polylysinbindungsstellen mit foetalem Rinderserum 10 min. bei R.T. abgesättigt werden.

16.4.2. Immunabsorption der fluoreszenzmarkierten 2. Antikörper

Mit PBS gewaschene Mäuseembryonalzellen oder STU 51A-232B-Zellen wurden mit Ultraschall homogenisiert. Nach Fällung mit 10 % TCA wurde der Niederschlag einmal mit Ethanol: Ether (1:1), danach zweimal mit PBS gewaschen. An dem gewaschenen Niederschlag wurde der fluoreszenzmarkierte 2. Antikörper 1 h bei 37°C absorbiert. Der Überstand wurde dann portioniert und bei -20°C dunkel aufbewahrt.

16.4.3. Fixierung

a) Oberflächenfärbung

Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden 10 min mit 1 % Formaldehyd in PBS bei R.T. fixiert und anschließend zweimal 5 min mit PBS gewaschen.

b) Färbung intrazellulärer Komponenten

Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden 10 min. mit 4 % Formaldehyd in PBS bei R.T. fixiert und anschließend 10 min. mit Methanol bei R.T. permeabilisiert. Danach wurde zweimal 5 min. mit PBS gewaschen.

16.4.4. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

a) Einfachfärbung

Die Zellen wurden 45 min bei 37°C mit dem 1. Antikörper (Verdünnungen zwischen 1:30 bis 1:80) inkubiert. Nach dreimal 10 min. Waschen mit PBS bei R.T. wurde 45 min mit dem fluoreszenzmarkierten 2. Antikörper (Verdünnungen zwischen

1:50 bis 1:80) inkubiert. Danach wurde dreimal 10 min bei RT gewaschen und dann in Glycerol:PBS (9:1) eingebettet.

b) Doppelfärbung

Die Zellen wurden 45 min. bei 37°C mit den beiden ersten Antikörpern (aus Ratte und Kaninchen) inkubiert. Nach dreimal 10 min. Waschen bei R.T. mit PBS erfolgte eine 45 min Inkubation mit dem TRITC-markierten 2. Antikörper (Anti-Kaninchen IgG aus Ziege). Nach dreimal 10 min. Waschen mit PBS wurde 30 min bei 37°C mit Kaninchen-Normalserum (1:10 verdünnt) inkubiert. Danach wurde dreimal 10 min. mit PBS gewaschen und dann für weitere 45 min. bei 37°C mit FITC-markiertem 2. Antikörper (Anti-Ratten IgG aus Kaninchen) inkubiert. Nach dreimal 10 min Waschen mit PBS wurde in Glycerol:PBS (9:1) eingebettet.

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss II RS Mikroskop mit Automatik erstellt. Zur Dokumentation wurde Kodak TriX-Pan-Film verwendet.

17. In vivo Markierung von Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat

Logarithmisch wachsende STU-232B-Suspensionszellen (200 ml) mit einer Zelldichte von 1.5 - 2 x 10^6 Zellen/ml wurden 12 h in phosphatfreiem DMEM/10 % hitzeinaktiviertem FRS mit 1 mCi ^{32}P-Orthophosphat gerührt. Nach Markierung wurden die Zellen abgeerntet (200 g, 5 min.), einmal mit PBS gewaschen und in Portionen von 4 x 10^7 Zellen/ml bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

18. Isolierung von Nucleoli (modifiziert nach (90))

STU-51A-232B Suspensionszellen wurden abgeerntet (500 g, 5 min.) und zweimal mit PBS gewaschen. Der Zellniederschlag wurde in 20 Volumen modifiziertem RSB-Puffer (20 mM Tris-Cl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) aufgenommen und 10 min. auf Eis gestellt. Die gequollenen Zellen wurden 5 min. bei 600 g abzentrifugiert und in obigem Volumen RSB-Puffer resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension auf 0.2 % Nonidet P-40 gebracht und mit 2 Schlägen gedounced. Die Kerne wurden durch 5-minütige Zentrifugation gewonnen und in 10 Volumen (vom anfänglichen Zellvolumen) 0.25 M Saccharose, 10 mM $MgCl_2$ homogenisiert. Zur Reinigung wurden die Kerne durch ein Saccharosekissen (0.88 M Saccharose, 0.05 mM $MgCl_2$) gleichen Volumens 10 min bei 1200 g zentrifugiert. Zur Gewinnung der Nucleoli wurden die Kerne in 10 Volumen (vom anfänglichen Zellvolumen) 0.34 M Saccharose, 0.05 mM $MgCl_2$ aufgenommen und in Portionen von 20 ml 60 sec ultrabeschallt (Branson Sonifier, Microtip Stufe 7 entsprechend 100-120 Watt). Die Nucleoli wurden über eine Zentrifugation (20 min., 2000 g) durch ein Saccharosekissen (0.88 M Saccharose, 0.05 mM $MgCl_2$) erhalten.

19. Tests auf mitogene Aktivität

19.1. Mitogene Aktivität an Embryonalzellen (modifiziert nach (93))

Mäuseembryonalzellen (5×10^4 Zellen nach der 3. - 6. Passage) wurden 24 h in 1 ml DMEM/10 % hitzeinaktiviertem FRS und dann weitere 4 Tage in 1 ml DMEM/0.4 % hitzeinaktiviertem FRS bei 37°C, 95 % Luft/5 % CO_2 auf Costarplatten (16 mm) gehalten. Danach wurden die Proben in jeweils 50 µl DMEM/0.4 % hitzeinaktiviertem FRS zugesetzt; nach 16 h wurde für weitere 8 h mit jeweils 2.5 µCi (Methyl-^{3}H)-Thymidin

in 50 µl PBS inkubiert. Nach Absaugen des Zellüberstandes wurde der Zellrasen dreimal mit je 1 ml PBS/1 mM $CaCl_2$/ 1 mM $MgCl_2$ gewaschen. Die Zellen wurden in jeweils 500 µl 0.5 % SDS/1 mM EDTA lysiert. Die mit je 2 ml 10 % TCA/20 mM Natriumpyrophosphat (PP_i) gefällten Proben wurden über Glasfilterchen (Whatman GF/C) abgesaugt, zweimal mit je 5 ml 10 % TCA/20 mM PP_i nachgewaschen, 30 min. bei 100°C getrocknet, 2 h mit je 0.5 ml NCS inkubiert und nach Zugabe von 10 ml Toluolszintillator (siehe Kap. 5) im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgezählt.

19.2. Mitogene Aktivität an Thymocyten (modifiziert nach (116))

Eine Zellsuspension (100 µl) von Thymocyten (3 x 10^5 Zellen) in RPMJ-1640-Medium wurde für 4 h bei 37°C, 95 % Luft, 5 % CO_2 mit 100 µl Probe in RPMJ-1640-Medium auf Mikrotiterplatten (Greiner) inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei 37°C mit 1 µCi (Methyl-^{3}H)-Thymidin in 50 µl RPMJ-Medium wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Thymocyten mit einem automatischen Zellerntegerät (Automash II, Dynatech) auf Glasfilterchen gesaugt. Danach wurden die Filterchen getrocknet, 2 h mit 0.5 ml NCS bei 50°C inkubiert und nach Zugabe von 10 ml Toluolszintillator (siehe Kap. 5) gezählt.

20. Materialien

γ-^{32}P ATP, 10-40 Ci/mmol
γ-^{32}P GTP, 10-40 Ci/mmol
und Methyl-^{3}H Thymidin
wurden von Amersham Buchler bezogen.

Regulatorische Untereinheit (P 6022), Proteinkinase Inhibitor (P 8140), Anti Kaninchen IgG Peroxidase markiert (A 8275), Phosvitin (P 1253), p-Chloromercuriphenylsulfonat (C 4503), Mersalyl (M 8000), 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (D 8130), p-Hydroxy-Mercuribenzoat (H 0752), Poly-L-Lysin (P 1274), Casein (C 4765), Phosphoserin (P 0878), Phosphothreonin (P 1003), Orange G (O 1625), Malachit grün (M 8635) waren von Sigma-Chemie.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Calmodulin waren von Boehringer, Mannheim.

Staphylococcus aureus V8 Protease, FITC markiertes Anti Kaninchen IgG, TRITC markiertes Anti Kaninchen IgG und FITC markiertes Anti Ratten IgG waren von Miles, Frankfurt.

Kaninchen-Anti-Ratten IgG Peroxidasemarkiert war von Byk-Mallinckrodt.

DEAE-Sepharose und Phenylsepharose waren von Pharmacia, Freiburg.

Die gängigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

VI. ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRS	Foetales Rinderserum
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GZPP	Ganzzellphosphorylierungspuffer
β-Me	β-Mercaptoethanol
Mersalyl	o-[(3-Hydroxymercuri-2-methoxypropyl)-carbamoyl]-phenoxyessigsaures Natrium
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCMPS	p-Chloromercuriphenylsulfonat
PHMB	p-Hydroxymercuribenzoat
PKA	Phosvitinkinaseaktivität
POPOP	2,2'-p-Phenylenbis(5-phenyloxazol)
P_i	anorganisches Phosphat
PP_i	Pyrophosphat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RSA	Rinderserumalbumin
R.T.	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat

VII. LITERATUR

1. Krebs, E.G., Baevo, J.A. (1979). Ann. Rev. Biochem. 48, 923

2. Rubin, C.S., Rosen, O.M. (1975). Ann. Rev. Biochem. 44, 831

3. Hosey, M.M., Tao, M. (1977). Curr. Topics in Membr. and Transp. 9, 233

4. Nimmo, H.G., Cohen, P. (1977). Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8, 146

5. Greengard, P. (1978). Science 199, 146

6. Weller, M. (1979). Protein Phosphorylation, Pion Limited, London

7. England, P.J. (1980) The Enzymology of Post-translational Modifications of Proteins, Vol. 1, ed. by R.B. Freedman and H.G. Howkins. Acad. Press London New York

8. Rosen, O.M., Krebs, E.G. (1981). Protein Phosphorylation. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

9. Cohen, P. (1982). Nature 296, 613

10. Flockhart, D.A., Corbin, J.D. (1982). Critical Reviews in Biochemistry 12 (2), 133, ed. G.D. Fashman, CRC Press

11. Weller, M., Gordis, G., Virmaux, N., Mandel, P. (1975). Exp. Eye Res. 21, 405

12. Greengard, P. (1976). Nature 260, 101

13. Adelstein, R.S., Eisenberg, E. (1980). Ann. Rev. Biochem. 49, 921

14. Stull, J.T. (1980). Adv. Cyclic Nucleotide Res. 13, 39

15. Lazarides, E. (1980). Nature 283, 249

16. Ochoa, S., G. de Haro (1979). Ann. Rev. Biochem. 48, 549

17. Carpenter, G., King, L. Jr., Cohen, S. (1979). Nature 276, 409

18. Seals, J.R., McDonald, J.M., Jarett, L. (1979). J. Biol. Chem. 254, 6991

19. Marchmont, R.J., Houslay, M.D. (1980). FEBS Letters 118, 18

20. Cohen, S., Carpenter, G., King, L. Jr. (1980). J. Biol. Chem. 255, 4834

21. Ushiro, H., Cohen, S. (1980). J. Biol. Chem. 255, 8363

22. Mastro, A.M., Rozengurt, E. (1976). J. Biol. Chem. 251, 7899

23. Malkinson, A.M., McSwigan, C.E. (1978). Biochem. J. 172, 423

24. Chiang, T.M., Kang, E.S., Kang, A.H. (1979). Arch. Biochem. Biophys. 195, 518

25. Branton, P.E., Landry-Magnan, J. (1979). J. Cell Physiol. 100, 159

26. Senger, D.R., Wirth, D.F., Hynes, R.O. (1979). Cell 16, 885

27. Senger, D.R., Wirth, D.F., Hynes, R.O. (1980). Nature 286, 619

28. Summerhayes, J., Bo Chen, L. (1980). Nature 284, 462

29. Laszlo, A., Radke, K., Chin, S., Bissell, M.J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6241

30. Langan, T. (1980). Nature 286, 329

31. Bauer, H. (1981). Klin. Wochenschr. 59, 957

32. Kurth, R., Stegmann, J., Tanaka, T., Löwer, J., Frank, H. (1981). Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14, 443

33. Bishop, J.M. (1982). Scientific American 246 (3), 68

34. Hynes, R.O. (1979). Surfaces of Normal and Malignant Cells. John Wiley & Sons

35. Pfeifle, J. (1980). Diplomarbeit Tübingen

36. Ronquist, G., Agren, G. (1974). Upps. J. Med. Sci 79, 138

37. Chang, K.J., Cuatrecasas, P. (1974). J. Biol. Chem. 249, 3170

38. Mato, J.M., Koniju, T.M. (1976). Exp. Cell Res. 99, 328

39. Kinzel, V., Kübler, D., Mastro, A.M., Rozengurt, E. (1976). Biochim. Biophys. Acta 434, 281

40. Schlaeger, E.J., Koehler, G. (1976). Nature 260, 705

41. Kang, E.S., Gates, R.E., Farmer, D.M. (1978). Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1561

42. Majumder, G.C. (1978). Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 829

43. Remold-O'Donnell, E. (1979). J. Exp. Med. 148, 1099

44. Chiang, T.M., Kang, E.S., Kang, A.H. (1979). Arch. Biochem. Biophys. 195, 518

45. Rahmsdorf, H.J., Malchow, D., Gerisch, G. (1979). Cell Biol. Int. Rep. 3, 237

46. Makan, N.R. (1979). Biochim. Biophys. Acta 585, 360

47. Scott, R.E. (1980). J. Nat. Cancer Inst. 64, 1467

48. Yee, S.P., Branton, P.E. (1981). J. Cell Physiol. 106, 149

49. Pfeifle, J., Hagmann, W., Anderer, F.A. (1981). Biochim. Biophys. Acta 670, 274

50. Kübler, D., Pyerin, W., Kinzel, V. (1982). J. Biol. Chem. 257, 322

51. Committee on Standardized Nomenclature for Inbred Strains of Mice (1968). Cancer Res. 28, 391

52. Kulas, H.P., Marggraf, W.D., Koch, M.A., Diringer, H. (1972). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1755

53. Schindler, R., Ramseier, L., Schaer, J.G., Grieder, A. (1970). Exp. Cell Res. 59, 90

54. Graham, J.M. (1975). New Techniques in Biophysics and Cell Biology 2. ed. R.H. Pain, B.J. Smith. John Wiley & Sons

55. Hunter, M.J., Commerford, S.L. (1961). BBA 47, 580

56. Wallach, D.F.H., Schmidt-Ullrich, R. (1977). Methods in Cell Biology XV

57. Fahrney, D.E., Gold, A.M. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 997

58. Dicker, P., Heppel, L.A., Rozengurt, E. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2103

59. Mastro, A.M. (1979). J. Cell Physiol. 99, 349

60. Weller, M. (1974). Biochim. Biophys. Acta 343, 565

61. Rothstein, A. (1970). Curr. Topics in Membr. and Transp. 1, 136

62. Green, A.A., Hughes, W.L. (1955). Methods in Enzymology 1, 67

63. Levin, Ö. (1962). Methods in Enzymology 5, 27

64. Bernardi, G. (1971). Methods in Enzymology 22, 325

65. Hofstee, B.H.J., Otillio, N.F. (1978). J. of Chromatography 159, 57

66. Laemmli, U.K. (1970). Nature 227, 680

67. Mendel-Hartvig, J. (1982). Anal. Biochem. 121, 215

68. Kuo, J.F. (1974). J. Biol. Chem. 249, 1755

69. Goldstein, J.L., Hasty, M.A. (1973). J. Biol. Chem. 248, 6300

70. Baggio, B., Pinna, L.A., Moret, V., Siliprandi, N. (1970). BBA 207, 515

71. Porath, J. (1974). Methods in Enzymology 34, 13

72. Dahmus, M.E., Natzle, J. (1977). Biochemistry 16, 1901

73. Thornburg, W., Lindell, T.J. (1977). J. Biol. Chem. 252, 6660

74. Hathaway, G.M., Traugh, J.A. (1979). J. Biol. Chem. 254, 762

75. Tahara, S.M., Traugh, J.A., Sharp, S.B., Lundak, T.S., Safer, B., Merrick, W.G. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 789

76. Hathaway, G.M., Lundak, T.S., Tahara, S.M., Traugh, J.A. (1978). Methods in Enzymology 60, 495

77. Martin, R.G., Ames, B.N. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1372

78. Domagh, G.F., Chilla, R., Domschke, W., Engel, H.J., Sörensen, N. (1969). Z. Physiol. Chem. 350, 626

79. Hegenauer, J., Ripley, L., Nace, G. (1977). Anal. Biochem. 78, 308

80. Mc Kenzie, H.A. (1967). Adv. Protein Chem. 22, 56

81. Mechan, D.K., Olcott, H.S. (1949). J. Am. Chem. Soc. 71, 3670

82. Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzales, C., Calkins, D., Fischer, E.M., Krebs, E.G. (1971). J. Biol. Chem. 246, 1977

83. Portzehl, H., Caldwell, P.C., Rüegg, J.C. (1964). Biochim. Biophys. Acta 79, 581

84. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350

85. Burnette, W.N. (1981). Anal. Biochem. 112, 195

86. Sternberger, L.A., Immunochemistry. John Wiley & Sons 1979

87. Osborn, M., Weber, K. (1982). Methods in Cell Biology 24, 98

88. Krohne, G., Franke, W.W. (1980). Exp. Cell Res. 129, 167

89. Busch, H., Smetana, K. (1970). The Nucleolus, S. 448-463. Academic Press New York

90. Muramatsu, M., Onishi, T. (1978). Methods in Cell Biology 17, 141

91. Rudland, P.S., de Asua, L.J. (1979). Biochim. Biophys. Acta 560, 91

92. Gallwitz, D. (1981). Naturwissenschaften 68, 163

93. De Larco, J.E., Todaro, G.J. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4001

94. Andersson, J., Möller, G., Sjöberg, O. (1972). Cellular Immunology 4, 381

95. Burger, M.M. (1970). Nature 227, 170

96. Wang, T., Foker, J.E., Malkinson, A.M. (1981). Exp. Cell Res. 134, 409

97. Wu, B.C., Spohn, W.H., Busch, H. (1979). Cancer Res. 39, 116

98. Pinna, L.A., Clari, G., Moret, V. (1971). Biochim. Biophys. Acta 236, 270

99. Olson, M.O.J., Orrick, L.R., Jones, C., Busch, H. (1974). J. Biol. Chem. 249, 2823

100. Mamrack, M.D., Olson, M.O.J., Busch, H. (1979). Biochemistry 18, 3381

101. Lischwe, M.A., Smetana, K., Olson, M.O.J., Busch, H. (1979). Life Sciences 25, 701

102. Tsutsui, K., Tsutsui, K., Oda, T. (1980). Eur. J. Biochem. 108, 497

103. Olson, M.O.J., Guetzow, K., Busch, H. (1981). Exp. Cell Res. 135, 259

104. Prestayko, K.W., Klomp, G.R., Schmoll, D.J., Busch, H. (1974). Biochemistry 13, 1945

105. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193, 265

106. Bradford, M.M. (1976). Anal. Biochem. 72, 248

107. Porath, J., Asperg, K., Drevin, H., Axen, R. (1973). J. of Chromatography 86, 53

108. Pharmacia-Informationen: Affinity Chromatographie principles & methods

109. Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K. (1977). J. Biol. Chem. 252, 1102

110. Bergmeyer, U., Methoden der enzymatischen Analyse Bd. 1, 3. Aufl., Verlag Chemie Weinheim 1974

111. Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S., Candia, O.A. (1979). Anal. Biochem. 100, 95

112. Hunter, T., Sefton, B.M. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1311

113. Friemel, H.: Immunologische Arbeitsmethoden. 2. Aufl. Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1980

114. Crowle, A.J., Immundiffusion. Acad. Press 1973

115. Nigg, E.A., Sefton, B.M., Hunter, T., Walter, G., Singer, S.J. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5322

116. Söder, O., Ernstrøm, U. (1981). Thymus 3, 289

L e b e n s l a u f

05.11.1954 :	als Sohn von Helmut Pfeifle und seiner Ehefrau Wiltraud Pfeifle, geb.Keller in Stuttgart geboren.
Mai 1974 :	Abitur am Eberhard-Ludwigs-Gymnasium in Stuttgart.
1974-76 :	Studium der Chemie an der TU-Stuttgart
1976-80 :	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.
August 1980 :	Diplom in Biochemie
Okt.1980-Dez.1982:	Promotion am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen unter Anleitung von Prof.Dr. F.A. Anderer.

Meine akademischen Lehrer waren:

F.A. Anderer, E. Bayer, E. Fluck, K.G. Grell, J. Guglielmi, D. Mecke, H. Metzner, H. Probst, H. Remmer, K. Reutter, G. Weitzel, U. Weser.